



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Pesquisa de mutações pontuais em genes de *Plasmodium falciparum* associadas à resistência aos antimaláricos em
Timor-Leste

Joana Dias Meda

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MAIO, 2017



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Pesquisa de mutações pontuais em genes de *Plasmodium falciparum* associadas à resistência aos antimaláricos em Timor-Leste

Autor: Joana Dias Meda

Orientador: Doutora Maria de Fátima Carvalho Nogueira

Coorientador: Doutor Afonso Almeida

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Fátima Nogueira pelos conhecimentos, disponibilidade, atenção e paciência dada na orientação da tese.

Ao Doutor Afonso Almeida pela colaboração prestada na colheita das amostras utilizadas neste estudo, sem as quais não seria possível a sua realização.

Um agradecimento ao coordenador do Mestrado de Ciências Biomédicas Celso Cunha.

E aos meus colegas de mestrado e sobretudo de gabinete, por toda a ajuda, disponibilidade e ótima convivência que proporcionaram ao longo da realização do trabalho no IHMT.

Resumo

Em 2016 a malária foi considerada endêmica em 91 países e apesar do decréscimo, estima-se que em 2015 terão ocorrido cerca de 212 milhões de novos casos de malária a nível mundial. Face à propagação da resistência do *Plasmodium falciparum* à maioria dos medicamentos antimaláricos disponíveis, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização de terapêuticas combinadas à base de artemisinina (ACT) como tratamento da malária não complicada. Em Timor-Leste os ACTs foram implementados em 2007, sendo o artemeter-lumefantrina (AL) usado como tratamento de primeira linha da malária desde então. A resistência à artemisinina e seus derivados foi confirmada no Sudeste Asiático, por isso o risco de aparecimento e propagação de resistência à artemisinina e seus derivados tem levado a esforços no sentido de serem realizados estudos de resistência em todas as regiões endêmicas para a malária.

Nesse sentido, neste estudo pretendeu-se determinar a frequência de polimorfismos, nos genes *pfk13* e *pfmdr1*, associados à resposta aos ACTs em isolados de *P. falciparum* provenientes de Timor-Leste. Dois grupos foram estudados, sendo que as amostras do grupo A foram recolhidas entre 2003 e 2005 e as do grupo B entre 2012 e 2013, correspondentes aos períodos antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste, respetivamente. O gene *pfk13* e polimorfismos no codão 86 do gene *pfmdr1* foram analisados através de amplificação de DNA pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e sequenciação.

Em relação ao gene *pfk13* não se obteve nenhum polimorfismo nas sequências de ambos os grupos em estudo. Relativamente ao estudo de polimorfismos no codão 86 do gene *pfmdr1*, verificou-se um aumento significativo da prevalência do alelo selvagem (*wild-type*) N86 (35,8% para 50%) e uma diminuição do polimorfismo N86Y (64,2% para 34,6%), de 2003-2005 para 2012-2013. Foi descrito pela primeira em Timor-Leste, o polimorfismo N86F, tendo-se verificado uma prevalência de 15,4% (em 4 amostras) no período após a introdução dos ACTs.

Apesar de não se observarem polimorfismos no gene *pfk13* e de não se encontrarem descritos casos de falência terapêutica em Timor-Leste, estudos contínuos através do uso de marcadores moleculares que permitam a determinação de resistência aos antimaláricos são muito importantes de modo a detetar precocemente o aparecimento e evitar o alastramento de parasitas *P. falciparum* resistentes/tolerantes aos ACTs.

Palavra-chave: Malária, Timor-Leste, ACT, *pfk13*, *pfmdr1*.

Abstract

In 2016 malaria was considered endemic in 91 countries and despite this decrease, updated estimates indicate that 212 million malaria new cases occurred globally in 2015. The spread of resistance *Plasmodium falciparum* to several antimalarial drugs available, lead the World Health Organization (WHO) to recommends the use of artemisinin-based combination therapy (ACT) as the first-line treatment for uncomplicated malaria. In East-Timor the ACTs were implemented in 2007, being artemether-lumefantrine (AL) used has the first-line treatment for malaria since then. The resistance to artemisinin and derivatives was confirmed in Southeast Asia, therefore the risk of emerge and spread of resistance to artemisinin and derivatives has leading to efforts in the implementation of studies to control the resistance in all endemic regions to malaria.

The aim of this study is to determine the frequency of polymorphisms, in *pfk13* and *pfmdr1* genes, associated to the answer to the ACT in isolate of *Plasmodium falciparum* from East-Timor. Two groups were studied, the samples from the group A were collected between 2003 and 2005 and the group B were between 2012 and 2013, corresponding to the time before and after the introduction of ACTs in East-Timor, respectively. The *pfk13* gene and the polymorphism in the 86 codon of *pfmdr1* gene were analyzed by the amplification of DNA using a PCR (Polymerase Chain Reaction) method and sequencing.

No polymorphisms were detected in the sequencing of *pfk13* gene in both groups in study. Relatively to the polymorphism in the codon 86 of *pfmdr1* gene, we verified a significant increase of the prevalence of the wild-type N86 (35,8% to 50%) and a decrease of the polymorphism N86Y (64,2% to 34,6%), between 2003-2005 and 2012-2013. It was described for the first time in East Timor, the N86F polymorphism, which verified an increase of the prevalence to 15,4% (in 4 samples) in the period after the introduction of ACTs.

Despite no evidence of polymorphism in the *pfk13* gene and no failure of treatment for malaria in East-Timor, continued surveillance using molecular markers are very important to monitor de emergence and avoid the spread of parasites *P. falciparum* resistance/tolerance to ACTs.

Key Word: Malaria, East-Timor, ACT, *pfk13*, *pfmdr1*.

Índice

Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
1. Introdução	2
1.1 Malária	2
1.1.1 Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.2 Distribuição geográfica da Malária.....	3
1.3 Controlo e Eliminação da Malária	5
1.4 Antimaláricos.....	6
1.4.1 Resistência aos antimaláricos	7
1.5 Monitorização da Resistência aos Antimaláricos	8
1.5.1 Ensaio <i>in vivo</i>	8
1.5.2 Ensaio <i>in vitro</i>	9
1.5.3 Marcadores moleculares de resistência	10
1.6 Epidemiologia da Malária em Timor-Leste.....	12
1.7 Objetivos.....	16
2. Material e Métodos	18
2.1 <i>Clearance</i> ético.....	18
2.2 Material biológico.....	18
2.3 Extração de DNA.....	19
2.4 Determinar a presença de polimorfismos no gene <i>pfk13</i>	19
2.4 Determinar a frequência do gene <i>pfmdr1</i>	19
2.4.1 PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	20
2.4.2 Eletroforese em gel de agarose	22
2.4.3 Purificação do produto de PCR	22
2.4.4 Sequenciação de DNA.....	23

2.5 Análise estatística	23
2.6 Análise <i>in silico</i> do impacto dos SNPs na função da proteína.....	24
3. Resultados	26
3.1 Características das amostras	26
3.2 Amplificação dos fragmentos de interesse por PCR	26
3.3 Estudo comparativo da prevalência de polimorfismos no gene <i>pfk13</i> e no codão 86 do gene <i>pfmdr1</i> , antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste.....	27
3.3.1 Avaliação funcional do impacto do polimorfismo N86F na proteína codificada pelo gene <i>pfmdr1</i>	29
4. Discussão e Conclusão	32
5. Referências Bibliográficas	38
6. Anexos	44

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> . a – Hospedeiro humano; b – Hospedeiro mosquito. (Cowman <i>et al.</i> , 2012).....	2
Figura 2 - Mapa com os países (a azul) endêmicos para a malária em 2016, segundo a OMS.....	4
Figura 3 – Mapa do território de Timor-Leste.....	12
Figura 4 – Incidência da Malária entre 2008 e 2014, em Timor-Leste, segundo a OMS.	14
Figura 5 – Produtos de amplificação de DNA.....	26
Figura 6 - Variação temporal da prevalência dos polimorfismos no codão 86 do gene <i>pfmdr1</i> e do gene <i>pfk13</i> , antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste.	28
Figura 7 - Mutações no codão 86 do gene <i>pfmdr1</i> : hipótese de mutação sequencial....	29

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em <i>P. falciparum</i>	11
Tabela 2 - Características dos <i>primers</i> utilizados no estudo.....	20
Tabela 3 - Mistura da reação de PCR.	21
Tabela 4 - Condições de amplificação da reação de PCR.	21
Tabela 5 - Ciclos de incubação para purificação de DNA.....	23
Tabela 6 - Avaliação do impacto funcional do polimorfismo N86F na proteína codificada pelo gene <i>pfmdr1</i>	30
Tabela 7 – Resultado da análise dos polimorfismos do gene <i>pfk13</i> , pesquisados nas amostras do grupo A, referente ao período 2003-2005.	48
Tabela 8 – Resultado da análise dos polimorfismos do gene <i>pfmdr1</i> e <i>pfk13</i> , pesquisados nas amostras do grupo B, referente ao período 2012-2013.....	49

Lista de Abreviaturas

a.a - aminoácido

ACT - *Artemisin-based Combination Therapy* / Combinação de derivados da artemisinina

AL – artemeter + lumefantrina

AQ - amodiaquina

ART - artemisinina

AS - artesunato

CQ - cloroquina

DHA-P - dihidroartemisinina + piperaquina

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

MQ - mefloquina

PBS - *Phosphate Buffered Saline* / Tampão fosfato salino

PCR – *Polymerase Chain Reaction* / Reação em cadeia da polimerase

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SEA – Sudeste Asiático

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* / Polimorfismo pontual

SP - sulfadoxina-pirimetamina

WHO/OMS – World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Malária

A malária é uma doença causada por parasitas do género *Plasmodium* sendo transmitida pela picada do mosquito *Anopheles* fêmea. Existem cinco espécies diferentes que podem infetar e causar doença em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Destas espécies, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são os mais prevalentes e o *P. falciparum* o mais perigoso, uma vez que pode provocar casos de malária grave e cerebral e levar à morte.

1.1.1 Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*

A transmissão natural da malária envolve a infeção por parte do parasita de dois hospedeiros diferentes: o humano e o mosquito *Anopheles* fêmea (Figura 1).

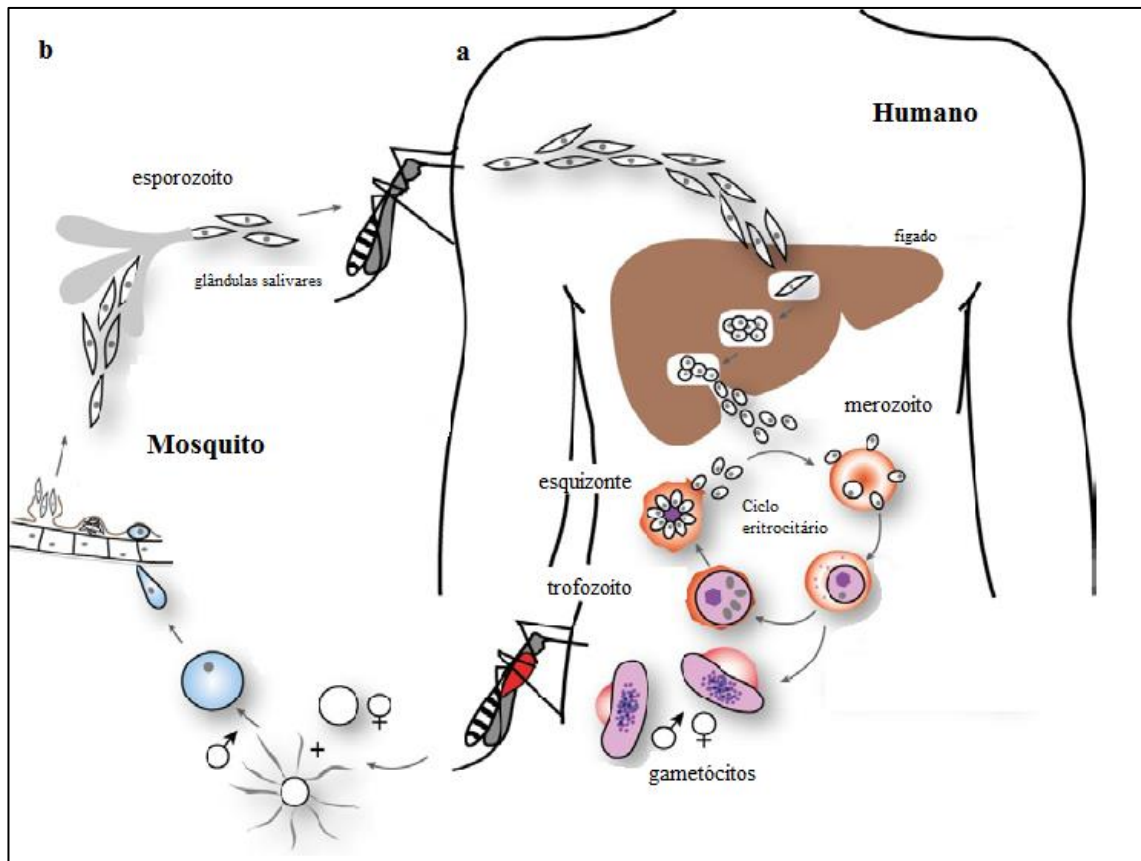


Figura 1 - Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. a – Hospedeiro humano; b – Hospedeiro mosquito. (Cowman *et al.*, 2012).

Nos humanos, o parasita, na forma de esporozoíto, infeta e multiplica-se nas células hepáticas, levando à sua ruptura o que permite a libertação de merozoítos na corrente sanguínea. Isto permite que o parasita inicie o seu ciclo eritrocitário ao infetar os glóbulos vermelhos continuando a sua diferenciação para trofozoíto e de seguida para esquizonte que depois de maduro leva à lise dos glóbulos vermelhos e à libertação de novos merozoítos na circulação sanguínea, sendo nesta fase que aparecem os sintomas da doença. Durante o ciclo eritrocitário, alguns merozoítos depois de infetarem os glóbulos vermelhos diferenciam-se em formas sexuadas, os gametócitos, os quais vão permitir a transmissão da malária para o mosquito aquando da sua refeição sanguínea (Cowman *et al.*, 2012; Bousema *et al.*, 2014).

Deste modo no mosquito, inicia-se um novo ciclo de desenvolvimento e multiplicação do parasita, o qual após 10 a 18 dias de maturação origina esporozoítos que invadem as glândulas salivares do mosquito. Nesta fase os parasitas estão aptos a infetarem o hospedeiro humano aquando da refeição sanguínea do mosquito. Assim, o mosquito atua como vetor uma vez que pode transmitir a doença de um humano para o outro. Os parasitas *P. vivax* e o *P. ovale*, podem apresentar casos de recorrência, devido à reativação de formas latentes do parasita (hipnozoítos) que podem permanecer no fígado e causar novamente doença ao fim de meses ou até mesmo anos depois da infeção dos glóbulos vermelhos ter sido tratada (Cowman *et al.*, 2012; Bousema *et al.*, 2014).

1.2 Distribuição geográfica da Malária

No início de 2016, a malária foi considerada endémica em 91 países e territórios, tendo havido um decréscimo nos últimos anos, sendo que em 2000 eram descritos 108 países endémicos para a malária (Figura 2) (WHO, 2016).

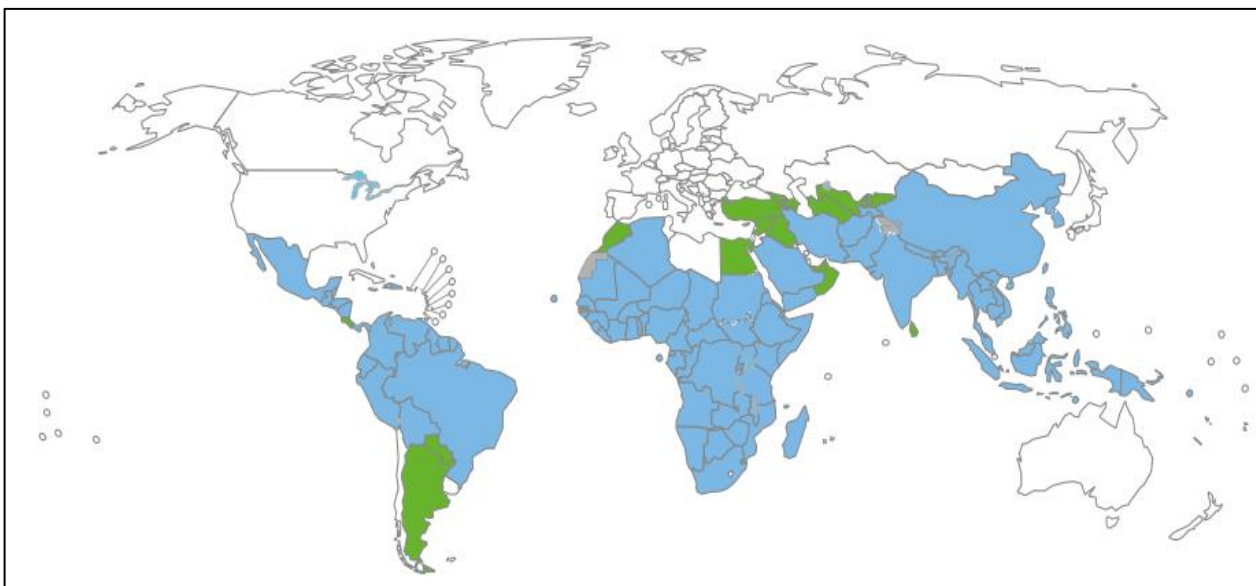


Figura 2 - Mapa com os países (a azul) endêmicos para a malária em 2016, segundo a OMS.

Estima-se que em 2015 terão ocorrido cerca de 212 milhões de novos casos de malária a nível mundial, havendo no entanto, um decréscimo de 22% desde 2000. A grande maioria dos casos, cerca de 90%, foi registada no continente Africano, seguida da região do Sudeste Asiático (SEA) com 7% (WHO, 2016).

A mortalidade, em 2015, foi estimada em cerca de 429.000 pessoas a nível mundial ocorrendo uma descida de 50% desde 2000. A maioria das mortes estima-se terem ocorrido no continente Africano (92%) e na região do Sudeste Asiático (6%). A principal espécie responsável pela mortalidade no continente Africano, foi o *P. falciparum*.

Apesar do decréscimo do número de mortes por malária em crianças com menos de 5 anos, esta continua a ser a uma das principais causas de morte infantil, estimando que uma criança morre a cada 2 minutos (WHO, 2016).

1.3 Controlo e Eliminação da Malária

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como controlo da malária a redução da incidência, prevalência, morbilidade e mortalidade para níveis, localmente, aceitáveis como resultado de medidas implementadas (WHO, 2016a).

Entre 2000 e 2014, houve uma expansão da implementação de medidas essenciais no combate à malária, no entanto as conquistas alcançadas são frágeis e distribuídas desigualmente. O número de mortes causadas pela malária e o risco que a doença ainda representa em todo o mundo continuam a ser inaceitavelmente elevados (WHO, 2015; WHO, 2016). Tendo em conta este problema, foi criada pela OMS uma Estratégia Técnica Mundial para a Malária 2016-2030 (WHO, 2015). Esta estratégia técnica constitui um quadro para a elaboração de programas adequados e destinados a acelerar os progressos no controlo e eliminação da malária. A estratégia baseia-se em três pilares, que orientam os esforços mundiais de aproximação à eliminação da malária:

Pilar 1. Garantir o acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento da malária; Pilar 2. Acelerar os esforços para a eliminação e obtenção do estatuto de país livre de malária e Pilar 3. Transformar a vigilância da malária numa intervenção essencial (WHO, 2015).

Apesar do sucesso que estas estratégias podem ter quando devidamente aplicadas e apoiadas existem desafios que podem influenciar a implementação das medidas, com consequente impacto no progresso do controlo da malária. Dentro desses desafios destacam-se: as dificuldades na implementação de um diagnóstico em tempo útil, deteção de parasitémias subpatentes, a resistência por parte dos parasitas (nomeadamente *P. falciparum*) aos antimaláricos e dos mosquitos (vetores) aos inseticidas (WHO, 2015; Moonen *et al.*, 2010).

Entre 2000 e 2015, o número de países que conseguiram atingir níveis de menos de 1000 casos de malária por ano, passou de 13 para 33 países. Até 2015, dos 13 países que atingiram menos de 1000 casos de malária, quatro foram certificados como *malaria-free* (WHO, 2016a). Os países onde a malária já foi eliminada devem ter um plano de prevenção robusto para impedir novos casos de transmissão da malária, nomeadamente mantendo a vigilância dos casos importados (Moonen *et al.*, 2010; WHO, 2017).

1.4 Antimaláricos

Os fármacos antimaláricos têm como principal objetivo a eliminação dos parasitas presentes na circulação sanguínea o mais rapidamente possível, de modo a evitar que a doença progrida para um estado mais grave ou morte. Em termos de saúde pública pretende-se diminuir a transmissão de infeção entre a população e prevenir o aparecimento e dispersão de resistência aos antimaláricos (WHO, 2015a; WHO, 2016).

Desde 2010 que a OMS recomenda apenas administrar antimaláricos após diagnóstico confirmatório através de microscopia ou testes de diagnóstico rápido (WHO, 2015). Desde 2006, que a OMS, recomenda como tratamento para a malária uma terapêutica de combinação à base de artemisinina (ACT) (WHO, 2001; WHO, 2010). Os ACTs consistem na combinação de um derivado de artemisinina (ART) com um fármaco parceiro, com uma semi-vida mais longa, um farmacóforo e mecanismo de ação diferentes. Nos ACTs, o derivado de artemisinina (sendo um fármaco de ação rápida), tem o papel de reduzir drasticamente o número de parasitas nos primeiros 3 dias de tratamento. Enquanto o fármaco parceiro (de ação mais lenta), elimina os parasitas residuais (WHO, 2001; WHO, 2016b). Algumas, outras, vantagens que levam ao uso do ACT prendem-se com o facto de: reduzirem rapidamente a parasitémia, a rápida resolução dos sintomas clínicos, ação contra *P. falciparum* que apresentem resistência a vários fármacos e terem ação ao nível dos gametócitos do parasita, permitindo uma diminuição da transmissão (WHO, 2001).

Genericamente, a OMS recomenda 5 ACTs para o tratamento de malária não complicada por *P. falciparum* (WHO, 2015a):

- artemeter + lumefantrina (AL)
- artesunato + amodiaquina (AS+AQ)
- artesunato + mefloquina (AS+MQ)
- artesunato + sulfadoxina-pirimetamina (AS+SP)
- dihidroartemisinina + piperaquina (DHA-P)

Recentemente foi introduzido um novo ACT, artesunato + pironaridina, que já está registado e em uso em alguns países (WHO, 2015a). No entanto, este apresenta

uma ineficácia em áreas onde existe resistência à artemisinina e à piperaquina, não sendo ainda recomendado pela OMS para uso geral (WHO, 2015a; Leang *et al.*, 2016).

Apesar das recomendações da OMS que desde 2007 tenta limitar o uso de monoterapia oral de ART e de seus derivados, sete países no mundo mantinham em 2015 a comercialização destes. Esta medida é de elevada importância uma vez que este tipo de tratamento é considerado como um fator promotor para o desenvolvimento de resistência às artemisininas (WHO, 2014).

1.4.1 Resistência aos antimaláricos

A resistência aos antimaláricos por parte do *P. falciparum* é o principal obstáculo ao controlo e eliminação da malária. Resistência aos antimaláricos está definida como a capacidade do parasita de sobreviver ou de se multiplicar apesar da administração e absorção de um fármaco dado na dose adequada (WHO, 2015a).

A principal consequência da resistência aos antimaláricos é a falência do tratamento. O aparecimento de resistência aos antimaláricos tem como base eventos genéticos, que ocorrem independentemente do fármaco, podendo ser selecionados parasitas caso confirmem sobrevivência na presença do fármaco. Os mecanismos genéticos de resistência que têm sido descritos até à data são mutações pontuais (SNPs) ou alterações no número de cópias dos genes relacionados com os alvos do fármaco ou com as bombas do fármaco, afetando a concentração intra-parasitária do fármaco. Apenas um evento genético isolado pode ser suficiente para conferir resistência (WHO, 2015a).

O primeiro fármaco com casos documentados de falência terapêutica devida à resistência do parasita foi a cloroquina (CQ). Isto ocorreu no final da década de 1950 ao longo da fronteira entre o Camboja e a Tailândia, aparecendo na África Subsariana e na América do Sul, anos mais tarde (WHO, 2005; WHO, 2016b).

A dispersão de parasitas resistentes à CQ teve consequências catastróficas, levando ao aumento de milhões de casos de malária por *P. falciparum* em todo o mundo. A combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP) foi usada como o antimalárico de substituição da cloroquina. No entanto no final da década de 1960, surgem os primeiros casos de resistência a este fármaco. E na década de 1980, foi confirmada a resistência à

mefloquina, também na sub-região do grande Mekong (WHO, 2016b; Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Mais recentemente, em 2008 foi confirmada a resistência à artemisinina ao longo da fronteira do Camboja e Tailândia (WHO, 2016b; Menard & Dondorp, 2017). De imediato, a OMS procedeu a medidas de contenção para evitar o alastramento desta resistência. No entanto a resistência à artemisinina já foi detectada em 5 países da sub-região do grande Mekong e em algumas áreas já atingiu valores alarmantes (WHO, 2016b; Menard & Dondorp, 2017).

1.5 Monitorização da Resistência aos Antimaláricos

A OMS adverte para a monitorização da eficácia terapêutica dos fármacos antimaláricos como parte necessária do programa de vigilância e ferramenta orientadora da política terapêutica da malária, recomendando a mudança do tratamento de primeira linha quando a taxa de falência é superior a 10% dos casos tratados (WHO, 2016c).

Os métodos de estudo da eficácia terapêutica baseiam-se na combinação de ensaios clínicos (*in vivo*), resultados dos testes *in vitro* de suscetibilidade aos antimaláricos e marcadores moleculares (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

1.5.1 Ensaios *in vivo*

Os estudos de eficácia terapêutica baseiam-se na resposta clínica e parasitológica, num período de tempo definido, de um indivíduo com infeção sintomática por *P. falciparum* ao qual é administrado uma dose padrão (recomendada) do antimalárico em avaliação. O procedimento e avaliação dos resultados devem seguir um protocolo preestabelecido pela OMS, e tipifica 4 níveis de resposta aos antimaláricos (WHO, 2009; WHO, 2016d):

- **Resposta parasitológica e clínica adequada:** ausência de parasitémia no dia 28 (ou dia 42), em doentes sem critérios prévios de falência terapêutica;

- **Falência terapêutica precoce:** sinais de malária severa no dia 3, parasitemia no dia 2 superior ao dia 0, parasitemia persistente no dia 3;
- **Falência clínica tardia (entre o 4º e 28/42º dia):** presença de parasitemia em qualquer dia entre o dia 4 e 28 (42) e temperatura $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$;
- **Falência parasitológica tardia (a partir do 7º dia):** parasitemia entre os dias 7 e 28 (42) com temperatura $< 37.5^{\circ}\text{C}$.

O tempo de seguimento clínico e parasitológico mínimo é de 28 dias (nalguns casos é de 42 dias) e é necessário incluir a genotipagem por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para distinção entre recrudescência e reinfeção (WHO, 2009). Estes ensaios podem ser ainda afetados por outros fatores que contribuem para a parasitemia recorrente em países endêmicos, como a falta de cumprimento terapêutico, fármacos contrafeitos ou de pouca qualidade, variações farmacocinéticas individuais e/ou populacionais e diferentes graus de imunidade do hospedeiro (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

Devido a múltiplos fatores de confusão, a falência da terapêutica no ensaio *in vivo* não significa necessariamente resistência parasitária ao fármaco utilizado, sendo necessário recorrer a outros métodos para confirmar a existência de resistência dos parasitas (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

1.5.2 Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* baseiam-se na cultura dos parasitas sob diversas concentrações de fármacos, sendo avaliada a sensibilidade intrínseca do parasita ao fármaco. Estes ensaios permitem ultrapassar fatores de confusão relacionados com o hospedeiro (nomeadamente imunidade ou farmacocinética) ou dosagem inadequada (Abdul-Ghani *et al.*, 2014).

Os ensaios *in vitro* permitem: o estudo de resistência cruzada entre antimaláricos, estabelecer a sensibilidade basal de um fármaco que permita monitorizar a sua evolução após a sua introdução terapêutica, a monitorização espacial e temporal da suscetibilidade do parasita ao fármaco, revelando de forma precoce mudanças de

sensibilidade antes do aparecimento de resistência clínica e a validação de marcadores moleculares, devido à correlação destes com os resultados *in vitro* (WHO, 2010).

No geral, estes ensaios são traduzidos pela concentração do fármaco na qual 50% do crescimento do parasita é inibido (IC₅₀), obtendo-se assim um valor quantitativo de suscetibilidade. No entanto para os derivados da ART os valores de IC₅₀ são idênticos nas estirpes de *P. falciparum* resistentes e nas sensíveis a esses fármacos (Witkowski *et al.*, 2013), pelo que o IC₅₀ não constitui um parâmetro discriminatório de suscetibilidade. Para os derivados da ART, preconiza-se o uso de RSA (*ring-stage survival assay*) como medida de suscetibilidade *in vitro* para caracterizar a resposta ao fármaco antimalárico. Este parâmetro mede a sobrevivência de parasitas que foram expostos ao fármaco entre as 3 e as 9h após invasão, numa dose correspondente à terapêutica (700nM de dihidroartemisinina) (Witkowski *et al.*, 2013; Amaratunga *et al.*, 2014).

1.5.3 Marcadores moleculares de resistência

Estes marcadores baseiam-se na presença de mutações genéticas que conferem resistência a um determinado fármaco utilizado no tratamento da malária (WHO, 2010).

Teoricamente a vigilância sistemática da prevalência de marcadores moleculares de resistência, é uma ferramenta de deteção precoce de resistências emergentes, e em complemento com os resultados de outros testes (*in vivo* e *in vitro*), constitui um excelente suporte para a tomada de decisões sobre políticas terapêuticas eficazes para o controlo da doença (Wongsrichanalai *et al.*, 2002; Ekland & Fidock., 2007). A Tabela 1 mostra alguns marcadores moleculares associados à quimio-resistência em *P. falciparum*.

Salientando a sua importância, estudos relacionados com a presença da mutação K76T no gene *pfcr* permitiram no passado, documentar a disseminação da resistência à CQ tendo-se destacado a necessidade de medicamentos alternativos (Djimde *et al.*, 2001; Sidhu *et al.*, 2002).

Pesquisas relacionadas com os polimorfismos nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* foram igualmente vitais para a monitorização da resistência à SP e em conjunto com as

investigações clínicas, confirmaram a diminuição rápida e disseminada da sua eficácia (Sibley & Price, 2012).

O gene *pfmdr1* tem sido relacionado com a resistência a vários antimaláricos, como a cloroquina, quinino, mefloquina, artemisinina e derivados, podendo modular a sua susceptibilidade por dois mecanismos: amplificação génica e/ou mutações na sua sequência (Duraisingh & Cowman, 2005; Wurtz *et al.*, 2014; Veiga *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em *P. falciparum*.

Fármaco	Marcador	Associação com a resistência
Cloroquina	<i>pfcr1</i> K76T	<i>in vivo</i> bastante elevada
	<i>pfmdr1</i> N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y	<i>in vivo</i> ocasional
Sulfadoxina-pirimetamina	Pirimetamina: <i>pfldhfr</i> N51I, C59R, S108N, I164L	<i>in vivo</i> bastante elevada
	Sulfadoxina: <i>pfldhps</i> S436A, K437G, K540E, A581G, A613S/T	
Artemisinina	<i>pfk13</i> N458Y, Y493H, R539T, I543T, R561H, C580Y	redução da suscetibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>

No caso específico da artemisinina e seus derivados a diminuição de suscetibilidade do *P. falciparum* aos fármacos, aparece em alguns estudos associada à amplificação do gene *pfmdr1* (na sua forma selvagem) ou à presença de determinados SNPs no gene. Com isto, a vigilância das alterações na prevalência dos SNPs nas posições 86, 184, 1042 e 1246, pode servir como uma ferramenta de alerta precoce na emergência e dispersão de parasitas tolerantes/resistentes aos ACTs (Duraisingh & Cowman, 2005; Wurtz *et al.*, 2014; Veiga *et al.*, 2016; Mbaye *et al.*, 2016).

A pesquisa de marcadores moleculares tem tido um especial interesse como instrumento de deteção precoce de resistência. Neste sentido, em 2012, Cheesman *et al.* identificaram uma região genómica no cromossoma 13 que determinava cerca de 35.2% do componente hereditário associado a parasitas com uma taxa de eliminação mais lenta

no Camboja, Tailândia e Laos. Apesar de promissor, a avaliação mais pormenorizada deste *loci* não foi, ainda, reportada.

Em 2014, foram descritos polimorfismos em parasitas de amostras clínicas resistentes à artemisinina na região do Grande Mekong. Desta forma, foram identificados polimorfismos pontuais no gene codificante da proteína *kelch* K13 (gene PF3D7_1343700) de *P. falciparum* em isolados parasitários capazes de sobreviver a doses (com relevância terapêutica) de ART e derivados *in vitro* (Ariey *et al.*, 2014).

Os SNPs em *pfk13* (Tabela 1) foram posteriormente incluídos como ferramenta de vigilância de eficácia terapêutica e contenção da dispersão da resistência aos ACTs pela OMS (WHO, 2016d).

1.6 Epidemiologia da Malária em Timor-Leste

Timor-Leste, oficialmente denominado de República Democrática de Timor-Leste após a independência em 2002, ocupa a parte oriental da ilha de Timor, no Sudeste Asiático (SEA). O país ocupa uma área territorial de 14,610 metros quadrados, é constituído por 13 distritos e tem Díli como a capital do país (Figura 3) (RDTL, 2002). Em 2015, segundo dados da OMS, a população estimada era de 1,180 milhões de habitantes, dos quais 90% vivem em regiões onde pode ocorrer a transmissão da malária (WHO-TL, 2016).

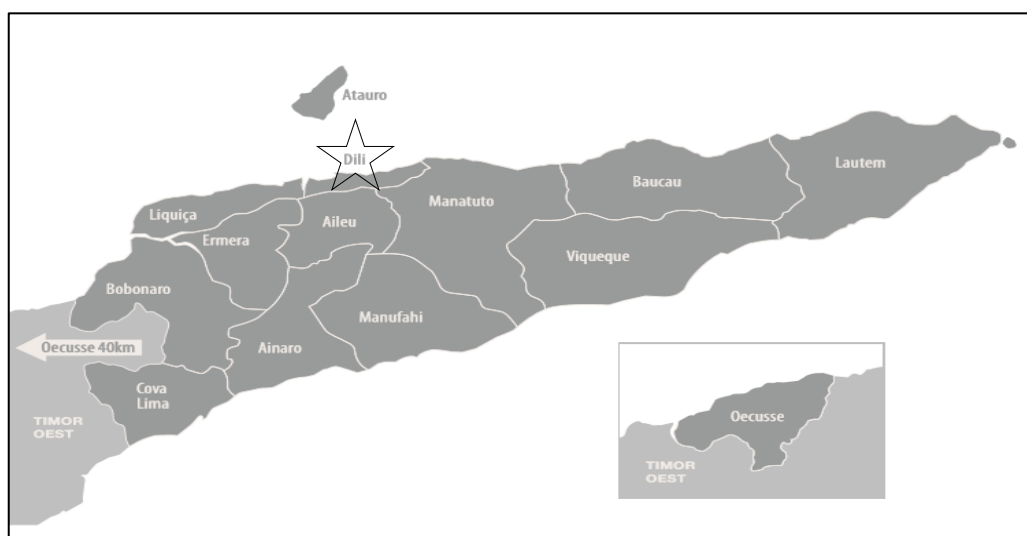


Figura 3 – Mapa do território de Timor-Leste.

A malária é endêmica em todo o país, constituindo um problema de saúde pública. As espécies de parasitas encontradas são o *P. falciparum* e *P. vivax*, estimando-se que a sua prevalência seja de 70% e 30%, respetivamente. Os vetores mais encontrados são da espécie: *An. subpictus* e *An. barbirostris* (WHO-TL, 2016). O pico de transmissão da malária ocorre entre Janeiro e Abril depois da época das chuvas (Yapabandara *et al.*, 2015).

Desde 2002 o país sofreu alterações no Programa de Tratamento da Malária, medidas tomadas pelo Ministério da Saúde. A primeira alteração ocorreu em 2002, quando a cloroquina, tratamento de 1ª linha usado desde então para infeções por *P. falciparum* e *P. vivax*, foi substituída pela sulfadoxina-pirimetamina (SP) para o tratamento de malária não complicada por *P. falciparum* (Martins *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). A cloroquina continua a ser usada como tratamento do *P. vivax* (WHO-TL, 2016).

Desde 2003, data em que foi criado pelo Ministério da Saúde, o Programa Nacional de Controlo da Malária, os protocolos clínicos para o tratamento da malária têm sido sucessivamente revistos (Martins *et al.*, 2013). Devido aos relatos de elevado número de casos de *P. falciparum* com resistência à CQ e SP, em 2007 a SP foi substituída pelo ACT, artemeter + lumefantrina (AL), mantendo-se este como o tratamento de 1ª linha até à data (Martins *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). Estudos realizados em Timor-Leste confirmam a presença de resistência do *P. falciparum* à SP, suportando a decisão tomada pelo Ministério da Saúde (Almeida *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2013). No tratamento dos casos em que a 1ª linha de tratamento falha, é usada a combinação de quinino + doxiciclina e para a malária grave podem ser usados: artemeter, artesunato e quinino, seguindo os protocolos da OMS (WHO-TL, 2016).

Desde 2007, que o diagnóstico da malária não complicada é apoiado pelo uso de testes de diagnóstico rápido nos centros de saúde de todo o território. Estes testes permitem diferenciar entre infeções por *P. falciparum* e por outras espécies (*P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*) (Yapabandara *et al.*, 2015; WHO-TL, 2016).

Timor-Leste tem vindo com sucesso a controlar os níveis de malária. No período entre 2000 e 2014 houve uma redução de 75% da incidência dos casos de malária (WHO, 2016e). Em relação aos níveis de mortalidade esta tendência também se verifica, sendo que houve uma redução de 93% da mortalidade entre 2006 e 2013,

passando de 58 mortes em 2006 para 3 em 2013. Relativamente aos casos de malária em crianças com menos de 5 anos, estes sofreram uma redução de 98% entre 2006 e 2012 (WHO, 2016e).

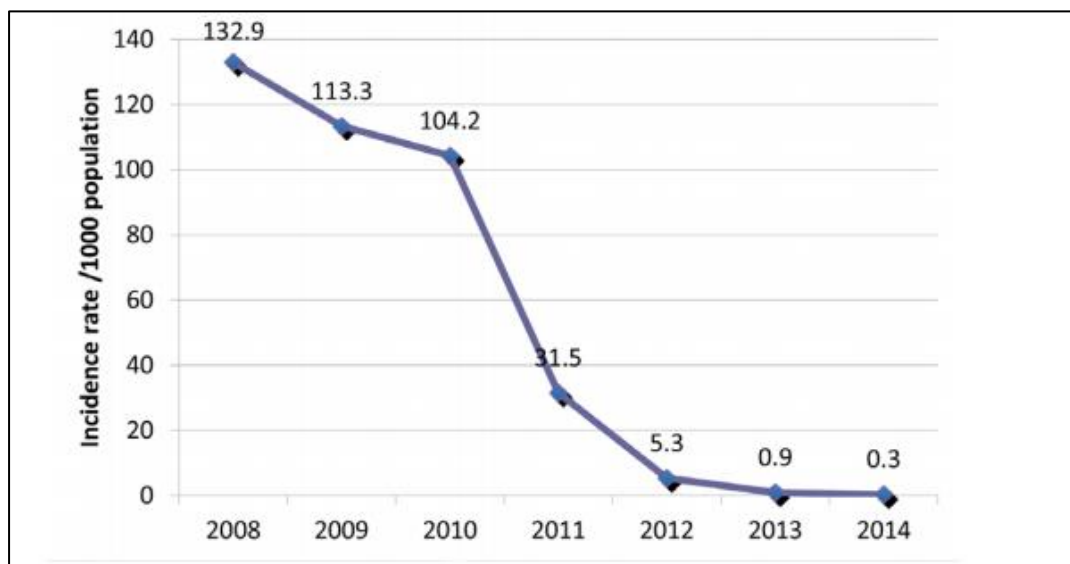


Figura 4 – Incidência da Malária entre 2008 e 2014, em Timor-Leste, segundo a OMS.

Esta redução mereceu em Setembro de 2014, por parte da Organização Mundial da Saúde para a Região do SEA, o Prémio de Excelência em Saúde Pública a Timor-Leste pelo Programa Nacional de Controlo da Malária (WHO, 2016e).

Devido aos resultados obtidos, Timor-Leste encontra-se numa fase de pré-eliminação. Encontrando-se na lista da OMS dos países que poderão atingir até 2020 a eliminação da malária, segundo o programa de Estratégia Técnica Mundial para a Malária 2016-2030 (WHO, 2016a).

No entanto, a recente confirmação de resistência às artemisininas e seus derivados e o risco de propagação, pode comprometer estes objetivos, não só em Timor-Leste como em outras regiões endémicas (Menard & Dondorp, 2017).

O risco de aparecimento e propagação de resistência à artemisinina e seus derivados tem levado a esforços no sentido de serem realizados estudos de resistência em todas as regiões endémicas para a malária (Menard *et al.*, 2016). Sendo por isso necessário que sejam realizados testes que permitam determinar a presença ou

prevalência de polimorfismos no gene *pfk13* (Fairhurst & Dondorp, 2016). E uma vez que a resistência à artemisinina e seus derivados aumenta o risco de resistência ao fármaco parceiro nos ACTs, é também importante o estudo de resistência ao fármaco parceiro através de marcadores moleculares específicos (WHO, 2015; Menard & Dondorp, 2017).

1.7 Objetivos

Objetivo geral

Determinar a frequência de polimorfismos genéticos potencialmente associados à resposta aos ACTs em isolados de *P. falciparum* provenientes de Timor-Leste, correspondentes aos períodos antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste.

Objetivos específicos

- a. Determinar a presença de polimorfismos nos genes *pfk13* e *pfmdr1* em isolados de *P. falciparum*.
- b. Avaliar a alteração da frequência dos polimorfismos nos genes *pfk13* e *pfmdr1* nos períodos antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste.

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1 Clearance ético

O protocolo de desenvolvimento do presente trabalho obteve a aprovação do Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) com o Parecer nº09-2016.

2.2 Material biológico

O material biológico utilizado neste estudo consistiu em amostras de DNA total, extraído de sangue em papel de filtro, de pessoas com diagnóstico parasitológico de infecção por *P. falciparum* provenientes da República Democrática de Timor-Leste. As amostras utilizadas foram divididas em dois grupos, grupo A e B, tendo em conta dois períodos temporais distintos.

As amostras do grupo A foram recolhidas entre 2003 e 2005 antes da introdução dos ACTs, tendo sido utilizadas num estudo anterior (Almeida *et al.*, 2009). Estas amostras encontram-se depositadas no repositório do laboratório da Malária do IHMT sob a forma de DNA total congelado a -20°C. As amostras do grupo B foram recolhidas entre 2012 e 2013, depois da introdução dos ACTs, no contexto do estudo de prevalência de malária levado a cabo pelo Programa Nacional de Controlo de Malária de Timor-Leste. As amostras foram enviadas para o IHMT sob a forma de gotas de sangue seco em papel de filtro, tendo sido retiradas 2-6 gotas de sangue do tubo de hemograma (colhido para fins de diagnóstico do paciente) após confirmação de diagnóstico positivo para *P. falciparum*. As amostras encontravam-se identificadas por sexo e ano de colheita. Estas serão posteriormente depositadas no repositório do laboratório da Malária do IHMT sob a forma de sangue em papel de filtro e de DNA total congelado a -20°C.

2.3 Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue em papel de filtro foi obtido com recurso ao método de extração com Chelex-100 (Kain *et al.*, 1991). Com auxílio de uma tesoura e uma pinça, previamente imersas em lixívia e água, foi cortada uma pequena porção de papel de filtro contendo a gota de sangue (o correspondente a cerca de 50 µL de eritrócitos parasitados), a qual foi colocada num tubo *eppendorf* de 1,5 mL. A hemólise dos eritrócitos parasitados foi efetuada mediante a adição de 1 mL de solução de 0,5% de saponina em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) tendo-se deixado esta mistura em incubação a 4°C, durante a noite. De seguida foi feita uma lavagem com PBS e nova incubação a 4°C por 30 minutos. A extração de DNA foi realizada mediante adição de 50 µL de solução de Chelex em Água Milli-Q a 20% e 150 µL de água esterilizada. A seguir, os tubos *eppendorf* foram aquecidos num bloco quente a 100°C durante 15 minutos, tendo-se procedido a uma centrifugação (14000rpm/2min), a fim de separar o sobrenadante contendo o DNA, dos restantes componentes da mistura (papel de filtro e Chelex) através da sedimentação. O DNA extraído foi conservado em alíquotas a -20° C até à amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

2.4 Determinar a presença de polimorfismos no gene *pfk13*

No decorrer do trabalho realizado foi analisado o gene com a referência no PlasmDB¹ de PF3D7_1343700, de 2181bp, que codifica a proteína *kelch* K13, para pesquisa de polimorfismos.

2.4 Determinar a frequência do gene *pfmdr1*

Realizou-se, também, a análise do gene com a referência no PlasmDB¹ de PF3D7_0523000, 4260bp, para determinação da frequência de polimorfismos no gene *pfmdr1*.

¹ Disponível em: <http://plasmodb.org/plasmo/showApplication.do>

2.4.1 PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *pfk13* e *pfmdr1* foram usados os protocolos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) descritos em (Escobar *et al.*, 2015) e (Lobo *et al.*, 2014), respetivamente com algumas alterações.

Para o estudo do gene *pfk13* foram usados dois pares de *primers* (Tabela 2) que continham os codões desde a posição 440 à 667 do gene PF3D7_1343700 (Anexo 1). Numa primeira reacção foi amplificado o fragmento com 714 pares de bases (bp), sendo utilizados os *primers* K13_PCR_F e K13_PCR_R. Na segunda reacção, foi utilizado um *Nested-PCR* usando os *primers* K13_Nested_F e K13_Nested_R, amplificando o fragmento com 445bp (Tabela 2).

Para o estudo do gene *pfmdr1* foi usado um par de *primers* MDR1_F e MDR1_R, amplificando o fragmento com 321bp (Tabela 2), permitindo o estudo de polimorfismos no codão 86 do gene PF3D7_0523000 (Anexo 2).

Tabela 2 - Características dos *primers* utilizados no estudo.

Gene	Nº reacção	Reacção	<i>Primers</i>	Sequência	Fragmento
<i>Pfk13</i>	1ª	PCR	K13_PCR_F	GAAAGAAGCAGAATTTTATGG	714bp
			K13_PCR_R	GATGGCAATTTCTAAATGGTGTAC	
	2ª	<i>Nested-PCR</i>	K13_Nested_F	GTGTAGAATATTTAAATTTCG	445bp
			K13_Nested_R	GGTGAGAGATTAAATTCTAT	
<i>Pfmdr1</i>	-	PCR	MDR1_F	GTATGTGCTGTATTATCAGGAGGA	321bp
			MDR1_R	GTGAGTTCAGGAATTGGTACG	

A mistura de reacção (Promega) foi formulada para um volume final de 20 µL, tendo sido colocados um controlo positivo e um branco em cada reacção de PCR. Na Tabela 3, encontram-se detalhados os reagentes e volumes usados na mistura da reacção de PCR.

Tabela 3 - Mistura da reação de PCR.

Reagentes	Concentração final	Volume (μL)
H ₂ O	-	10,3
Tampão de PCR	1 X	2
MgCl ₂	2 mM	1,6
dNTP's	200 μM	2
Primer_F	500 nM	1
Primer_R	500 nM	1
<i>Taq polimerase</i>	0,5 unidades	0,1
DNA	-	2

As condições de amplificação usadas no termociclador para amplificação do DNA encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de amplificação da reação de PCR.

Ciclo	Temperatura	Tempo (min)	Nº ciclos
1 (desnaturação inicial)	94°	3:00	1
2 (desnaturação)	94°	1:00	10
3 (hibridação)	59°	0:45	
4 (extensão)	72°	1:00	
5 (desnaturação)	94°	1:00	35
6 (hibridação)	52°	0:45	
7 (extensão)	72°	1:00	
8 (extensão final)	72°	3:00	1
9 (conservação)	4°	...	

As condições detalhadas nas Tabelas 3 e 4 foram usadas em ambos os estudos. Apenas houve alteração na mistura de reação da segunda reação de PCR, usada no *Nested-PCR*, na qual foi usado 1 µL de DNA da primeira reação, compensando com a adição de 11,3 µL de H₂O de modo a perfazer os 20 µL de volume final.

2.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos amplificados foram separados eletroforéticamente numa tina horizontal contendo tampão TBE 1x (preparado numa solução com concentração de 10x: 1M Tris, 1M Ácido Bórico, 50mM EDTA, pH 8,3). Os géis de agarose usados foram de 2%, consistindo numa mistura de 2 g de agarose e 100 mL de TBE 1x, com adição de 5 µL de brometo de etídeo. Em cada poço do gel foram colocados 10 µL do produto amplificado juntamente com 2 µL de tampão de corrida (*loading buffer* 6X da Thermo Scientific). Este contém um corante que permite a visualização da migração do DNA no gel no decorrer da eletroforese.

Ao mesmo tempo, colocou-se um marcador de pesos moleculares de DNA de 100 pb (Bioline). A separação durou cerca de 60 minutos, usando uma diferença de potencial de 120 V/cm. Por fim, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas.

2.4.3 Purificação do produto de PCR

Para purificação do produto de PCR amplificado foi usado o método enzimático Illustra ExoProStar 1-Step da GE Healthcare Life Science, sendo este um método rápido, eficiente e confiável, e totalmente otimizado para purificação de DNA. Foi usado o protocolo recomendado pelo fabricante, no qual para 5 µL de produto de PCR amplificado foi adicionado 2 µL de Illustra ExoProStar 1-Step, seguido de 2 ciclos de incubação descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Ciclos de incubação para purificação de DNA.

Ciclo	Temperatura	Tempo (min)
1º	37°C	15
2º	80°C	15

Este método permite a remoção dos *primers* e nucleótidos que não hibridaram garantindo um produto final de PCR preparado para poder ser sequenciado.

2.4.4 Sequenciação de DNA

A sequenciação dos produtos de PCR amplificados foi realizada na STAB VIDA², após envio dos produtos devidamente acondicionados. O método de sequenciação usado foi o método de Sanger.

O alinhamento das sequências foi realizado mediante a aplicação Multalin³ (Corpet, 1988). Nesta aplicação foi realizada a comparação das sequências de nucleóticos com os respectivos genes em estudo, gene PF3D7_1343700 e PF3D7_0523000, os quais se encontram depositados na base de dados PlasmoDB.

2.5 Análise estatística

A prevalência de alelos e polimorfismos nos grupos A e B foi comparada pelo teste de *Fisher's*. Os cálculos foram realizados recorrendo ao programa GraphPad Prism (*trial version*). A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$.

² Disponível em: <http://www.stabvida.com/pt/>

³ Disponível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

2.6 Análise *in silico* do impacto dos SNPs na função da proteína

De modo a estudar a previsão da alteração da função da proteína, na presença de polimorfismos, foi utilizada a ferramenta *on-line* PROVEAN⁴. Esta ferramenta permite estimar se a alteração na estrutura da proteína tem um impacto na função biológica da mesma (Choi & Chan, 2015).

⁴ Disponível em: <http://provean.jcvi.org/index.php>

3. Resultados

3. Resultados

3.1 Características das amostras

Das amostras do grupo A, utilizadas num estudo anterior (Almeida *et al.*, 2009) foram seleccionadas 21 amostras para análise do gene *pfk13*, tendo em conta dois factores: terem amplificado para todos os estudos realizados e não apresentarem infeções mistas. Estas amostras correspondem ao período anterior à introdução dos ACTs no país (2003-2005).

Relativamente às amostras do grupo B, foram recolhidas 30 amostras entre 2012 e 2013, com idades que variam entre os 7 e 35 anos. Estas amostras foram colhidas em Díli, provenientes de vários distritos de Timor-Leste.

3.2 Amplificação dos fragmentos de interesse por PCR

Relativamente ao estudo no gene *pfk13* a figura 5A mostra um exemplo de produto de amplificação da primeira reacção de PCR e da segunda reacção de *Nested-PCR*, com tamanhos de pares de bases concordantes com os pretendidos, 714bp e 445bp, respetivamente. A figura 5B, mostra um exemplo de amplificação do codão 86 no gene *pfmdr1*, que apresenta um tamanho de 321bp.

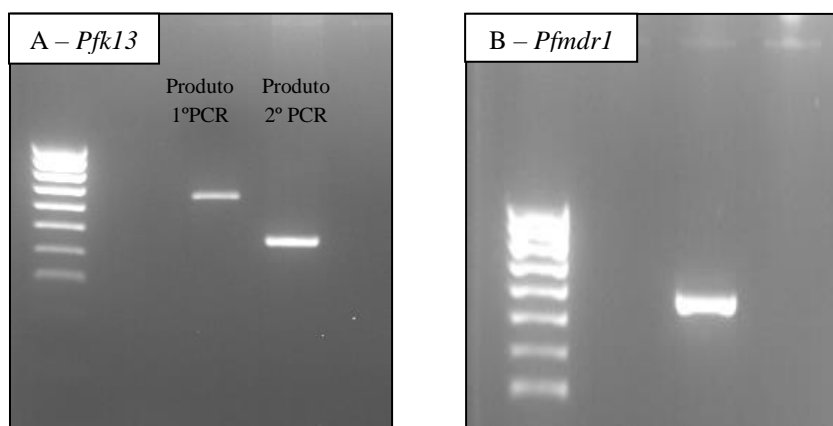


Figura 5 – Produtos de amplificação de DNA.
A) 1ª e 2ª reacção de PCR, no gene *pfk13*. **B)** Reacção de PCR, no gene *pfmdr1*.

Relativamente aos resultados obtidos da amplificação do gene *pfk13*, nas amostras do grupo A, das 21 amostras apenas 3 amplificaram na 1ª reação de PCR. As restantes, foram novamente amplificadas usando a reação de *Nested*-PCR. Não foi possível a amplificação de duas amostras. Relativamente às amostras do grupo B, das 30 amostras, 4 foram amplificadas na 1ª reação de PCR, nas restantes foi usada a 2ª reação de *Nested*-PCR. Não foi possível a amplificação de 8 amostras. Assim, foram enviadas para sequenciação: 19 amostras do grupo A e 22 amostras do grupo B.

Os resultados da amplificação das amostras do grupo B, para o estudo de polimorfismos no codão 86 do gene *pfmdr1*, permitiu a amplificação de 26 amostras, tendo sido posteriormente enviadas para sequenciação. Quatro amostras não foram amplificadas.

3.3 Estudo comparativo da prevalência de polimorfismos no gene *pfk13* e no codão 86 do gene *pfmdr1*, antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste

Da análise do alinhamento entre as sequências de nucleótidos das amostras com a sequência do *pfk13* com a estirpe 3D7 (PF3D7_1343700), para o estudo de polimorfismos no gene *pfK13*, não se obteve nenhum polimorfismo nas sequências de ambos os grupos de amostras em estudo. Como descrito na Figura 6, não foram observadas mutações no estudo do gene *pfk13* tanto nas amostras de 2003-2005 (grupo A) como nas amostras de 2012-2013 (grupo B).

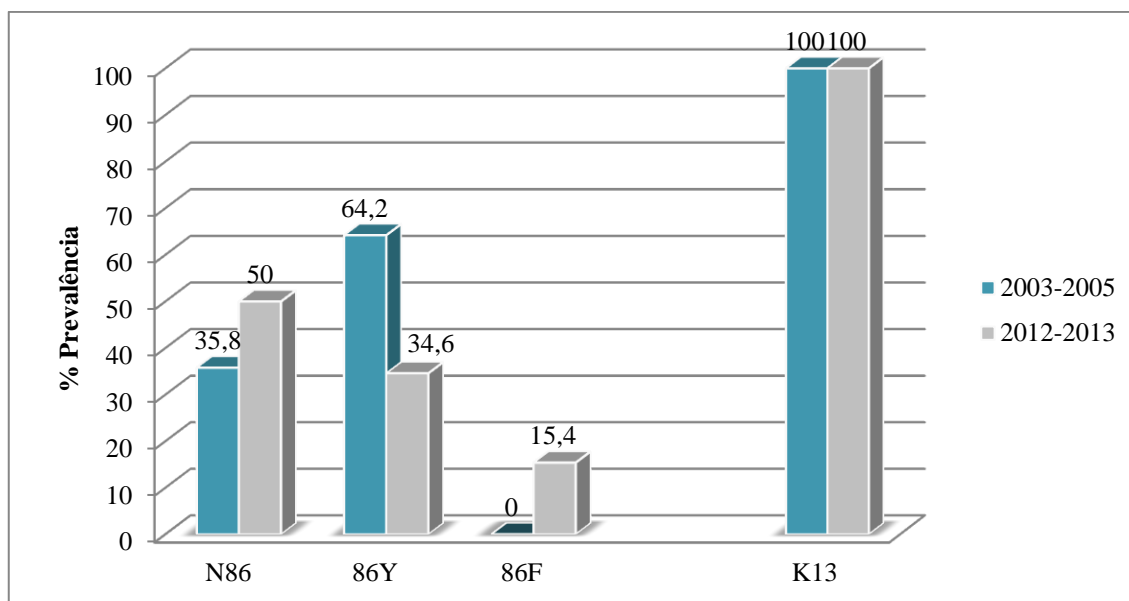


Figura 6 - Variação temporal da prevalência dos polimorfismos no codão 86 do gene *pfmdr1* e do gene *pfk13*, antes e depois da introdução dos ACTs em Timor-Leste.

Relativamente ao estudo de polimorfismos no codão 86, as sequências de nucleótidos das amostras do grupo B foram alinhadas com o gene *pfmdr1* da estirpe 3D7 (PF3D7_0523000), permitindo a identificação de dois polimorfismos (SNPs) não sinónimos. Em 9 amostras observou-se a variante Y (Tyr; tirosina) e em 4 amostras a variante F (Phe; fenilalanina) neste codão. As restantes 13 amostras apresentavam o genótipo *wild-type*, N86 (Asn, asparagina). No Anexo 3, encontra-se um exemplo de cada sequência de polimorfismos observados. Para o estudo de polimorfismos no gene *pfmdr1* nas amostras do grupo A (correspondente ao período antes da introdução dos ACTs) foram usados os resultados obtidos em um estudo realizado anteriormente em Timor-Leste (Almeida *et al.*, 2009). Para esta análise foram excluídas as infeções mistas N+Y.

A prevalência de SNPs no codão 86 em 2003-2005 (grupo A) e 2012-2013 (grupo B), é apresentada na Figura 6. Verifica-se uma variação temporal significativa ($p=0,048$) das prevalências do alelo selvagem (*wild-type*) N86 (aumento de 35,8% para 50%) e ($p=0,036$) do alelo mutante 86Y (diminuição de 64,2% para 34,6%) de 2003-2005 para 2012-2013. Relativamente, ao polimorfismo N86F, esta é a primeira vez que este é descrito em Timor-Leste, tendo havido um aumento significativo ($p=0,019$) de

0% em 2003-2005 para 15,4% em 2012-2013. Os resumos dos resultados de todas as amostras analisadas encontram-se nos Anexos 4 e 5.

3.3.1 Avaliação funcional do impacto do polimorfismo N86F na proteína codificada pelo gene *pfmdr1*

Como referido anteriormente, esta foi a primeira vez que o polimorfismo N86F foi descrito em Timor-Leste. Este polimorfismo é raramente descrito na literatura, um estudo coloca a hipótese que este seja uma alteração da mutação correspondente ao alelo 86Y (Figura 7). Pois uma vez que para originar o polimorfismo N86F (TTT), é necessária a alteração de duas bases no codão *wild type* de AAT (N86) para TTT (86F), enquanto que para transformar o alelo mutante 86Y (TAT) em 86F (TTT) apenas é necessária a alteração de uma base (Dlamini *et al.*, 2010; Beshir *et al.*, 2010).

	Normal N86	Mutação 86Y	Mutação 86F
Molécula DNA	AAT	TAT	TTT
Sequência RNA	AAU	UAU	UUU
Aminoácido	Asparagina	Tirosina	Fenilalanina
	N	Y	F




Figura 7 - Mutações no codão 86 do gene *pfmdr1*: hipótese de mutação sequencial.

De modo a prever se a alteração na sequência de aminoácidos provoca alterações na função biológica da proteína, foi usada a ferramenta *on-line* PROVEAN (Choi, & Chan, 2015). O polimorfismo correspondente a N86F apresentou um score de -3.217, o que leva a uma previsão funcional deletéria na função do gene *pfmdr1*, como se pode observar na Tabela 6. Este resultado vai de acordo com as suspeitas na relação com o polimorfismo N86Y, uma vez que este apresenta um score deletério de -3.577, no entanto mais estudos têm de ser realizados.

Tabela 6 - Avaliação do impacto funcional do polimorfismo N86F na proteína codificada pelo gene *pfmdr1*.

Variante	PROVEAN Score	Previsão (cutoff = -2.5)*
N86F	-3.217	Deleterious Deletério

*Para um *cut-off* de -2.5 o modelo de previsão funcional apresenta uma sensibilidade de 80.4% e especificidade de 78.6%. A precisão do modelo é de 77.9% na utilização em variantes de proteínas não humanas.

4. Discussão e Conclusão

4. Discussão e Conclusão

Este é o primeiro estudo de pesquisa de polimorfismos no gene *pfk13* em Timor-Leste. Um dos objetivos deste estudo consistiu em determinar a presença de polimorfismos no gene *pfk13*, que codifica a proteína *Kelch* 13, potencialmente associados à resistência à artemisinina e localizados a jusante do a.a. 440 (Ariey *et al.*, 2014). Apenas foi possível a amplificação desta região do gene em 7 amostras (três do grupo A e quatro do grupo B). Assim, e usando um *Nested-PCR* permitiu a amplificação de 34 amostras (16 do grupo A e 18 do grupo B). Consequentemente, o estudo incidiu na pesquisa das mutações no gene *pfk13* que já se encontram validadas como marcadores moleculares de suscetibilidade à artemisinina, sendo estas mutações: Y493H, R539T, I543T, R561H e C580Y (Fairhurst & Dondorp, 2016; WHO, 2016c). Após a análise das sequências das amostras em comparação com a sequência do *pfk13* da estirpe 3D7 (PF3D7_1343700) depositada na base de dados PlasmoDB, não se observou a presença de nenhum polimorfismo nas posições Y493H, R539T, I543T, R561H nem C580Y. O estudo da mutação N458Y, que foi recentemente validada como marcador molecular de suscetibilidade pela OMS (WHO, 2016d), apenas foi possível nas sete amostras que foram amplificadas na primeira reação de PCR, não se verificando também nenhuma alteração.

O facto de não se ter detetado polimorfismos no gene *pfk13* nas amostras em estudo pode ter ocorrido devido ao limitado número de amostras estudadas. Até ao momento já foram descritos mais de 200 mutações não-sinónimas no gene *pfk13* (WHO, 2016d) em várias áreas geográficas (Ménard *et al.*, 2016). Dado Timor-Leste estar localizado no SEA, seria de esperar que houvesse a presença de alguma mutação, sobretudo nas amostras correspondentes ao período após introdução dos ACTs no país (grupo B; 2012-2013). Outro fator para não se ter observado nenhuma mutação, pode dever-se ao facto de que desde a introdução dos ACTs em Timor-Leste em 2007, houve uma redução muito significativa da incidência de malária no país e a administração de ACTs é feita de uma forma mais criteriosa sendo apenas dada após confirmação do diagnóstico (Yapabandara *et al.*, 2015). Este facto pode ter conduzido a uma menor pressão do fármaco sobre os parasitas e com isto possa atrasar o aparecimento de mutações. A observação de ausência de polimorfismos no gene *pfk13* não é exclusiva de

Timor-Leste, estudo realizado na Malásia (situada também na região do SEA) em 2016 também não se observaram mutações no gene *pfk13*. A Malásia, encontra-se tal como Timor-Leste numa situação de pré-eliminação da malária (Norahmad *et al.*, 2016).

É importante, também, o estudo dos marcadores moleculares de resposta ao fármaco parceiro usado nos ACTs, uma vez que a resistência a estes fármacos se encontra já descrita em algumas regiões geográficas. Contribuindo desta forma para a falência da combinação, particularmente relevante no contexto atual em que a resistência aos ACTs está a tornar-se difundida no Sudeste Asiático (Menard & Dondorp, 2017).

Assim, outro dos objetivos deste trabalho pretendia a determinação da frequência de polimorfismos no gene *pfmdr1*, nomeadamente no codão 86. O gene *pfmdr1* encontra-se associado à resistência a vários antimaláricos, incluindo a cloroquina (Atroosh *et al.*, 2012) e a lumefantrina (Menard & Dondorp, 2017). Este é o fármaco que, em combinação com o artemeter (AL), constitui a primeira linha de tratamento da malária não complicada em Timor-Leste desde 2007 (Martins *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013).

Após a análise dos resultados relativamente ao gene *pfmdr1* pode-se verificar que antes da introdução dos ACTs a prevalência do alelo N86 (*wild-type*) era inferior ao mutante 86Y, enquanto após a introdução dos ACTs a prevalência do alelo N86 subiu para 50%. O aumento do alelo N86 de *pfmdr1* e diminuição do 86Y era o esperado (Lekana-Douki *et al.*, 2011) e corrobora inúmeros estudos que sustentam a pressão que a cloroquina exerce na seleção do alelo 86Y (Holmgren *et al.*, 2006; Happi *et al.*, 2006). A cloroquina embora gradualmente substituída pela SP, permaneceu extensivamente usada em Timor-Leste até à introdução dos ACTs (Kolaczinski & Webster, 2003; Morris, 2001; Arbani & Petersen, 1999; Andjaparidze *et al.*, 2000; Ezard *et al.*, 2000). Justificando a maior prevalência do polimorfismo N86Y (64,2%) no período anterior ao uso dos ACTs. De facto entre 1999 e 2000 estão documentados altos níveis de resistência *in vitro* e *in vivo* à cloroquina em Timor-Leste (Kolaczinski & Webster, 2003; Morris, 2001; Arbani & Petersen, 1999; Andjaparidze *et al.*, 2000; Ezard *et al.*, 2000).

Com o abandono da cloroquina e introdução da combinação AL essa pressão seletiva foi aliviada permitindo a recuperação do alelo selvagem N86, que passou de

uma prevalência de 35,8% para 50%. Esta recuperação dos alelos selvagens de *pfmdr1* pode dever-se ao impacto no *fitness*. No *P. falciparum* as mutações de *pfmdr1* associadas com resistência à cloroquina implicam um custo de *fitness*, aumentado em relação aos alelos selvagens (Hayward *et al.*, 2005), assim na ausência de pressão seletiva da cloroquina os alelos selvagens tendem a sofrer expansão (Mita *et al.*, 2003; Mita *et al.*, 2004; Kublin *et al.*, 2003).

A presença do alelo mutante 86Y está associado ao aumento da resistência à cloroquina (Atroosh *et al.*, 2012; Veiga *et al.*, 2016) enquanto que o alelo N86 (*wild-type*) encontra-se associado ao aumento da tolerância à lumefantrina (Sisowath *et al.*, 2005; Sisowath *et al.*, 2007). De facto os dados do nosso estudo (embora o pequeno número de amostras limite a generalização da análise) manifestam esta tendência de aumento da prevalência do alelo N86 indo de acordo com outros estudos (Djimde *et al.*, 2015). No entanto, mais estudos têm de ser realizados, alargando o estudo a outros polimorfismos no gene *pfmdr1*, nomeadamente à posição 1042, parte dos haplótipos N86-N1042 descrito no Sudeste Asiático como estando associado à diminuição da suscetibilidade à lumefantrina (Nzila *et al.*, 2012; Djimde *et al.*, 2015) e o N86-184F-1246D, sobretudo em países do continente africano (Humphrey *et al.*, 2007; Otienoburu *et al.*, 2016).

Relativamente ao polimorfismo N86F, esta foi a primeira vez que foi descrito em Timor-Leste, tendo-se registado um aumento significativo de 0% para 15,4% depois da introdução dos ACTs. É provável que este polimorfismo resulte de uma alteração do codão da mutação 86Y (TAT) e não de uma alteração do *wild-type* N86 (AAT). Uma vez que para originar 86F (TTT) a partir de 86Y (TAT) apenas é necessária a alteração de uma base, enquanto a partir de N86 (AAT) seria necessária a alteração de duas bases em simultâneo, um acontecimento menos provável (Dlamini *et al.*, 2010). Devido à falta de dados, ainda não é possível concluir que implicações este polimorfismo pode ter.

No nosso trabalho, apesar de este polimorfismo ter sido descrito apenas nas amostras de 2012-2013 (grupo B), isto não significa que esta mutação tenha surgido no período que separa os dois grupos de amostras. Pois, este polimorfismo já tinha sido descrito por Cowman *et al.*, 1994, ou seja, já tinha sido descrito anteriormente ao estudo realizado por Almeida *et al.*, 2009 em Timor-Leste. No estudo realizado por Almeida *et*

al., 2009, a técnica usada para identificar os polimorfismos foi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica consiste na análise de polimorfismos por restrição dos fragmentos de DNA genómico amplificado por PCR. A enzima de restrição usada nesse trabalho (*ApoI* r/AATTy) apenas discrimina a presença ou ausência de A na 1ª base do codão AAT (N86), restringindo o fragmento. Assim os codões TAT e TTT seriam classificados como TAT e portanto, 86Y. Embora a sua associação à resposta a antimaláricos seja pouco estudada este SNP foi detetado em amostras de pacientes com falência terapêutica à amodiaquina (Beshir *et al.*, 2010), em populações naturais de parasitas sob pressão de cloroquina (Dlamini *et al.*, 2010) e *in vitro* em estirpes sob seleção de mefloquina (Cowman *et al.*, 1994). O uso genérico da técnica RFLP para o estudo de SNPs em *pfmdr1* pode ser uma das razões pelo qual é pouco frequentemente descrito.

Recorrendo a um algoritmo de uso livre *online* (PROVEAN) foi possível estabelecer que a alteração no codão de AAT para TTT (86F) produz previsivelmente um impacto funcional na proteína codificada, sendo o score atribuído pelo algoritmo da mesma ordem do produzido pela alteração de AAT para TAT (86Y). Mais estudos a realizar no futuro poderão confirmar a prevalência deste polimorfismo e o impacto que este pode ter na resposta do *P. falciparum* aos antimaláricos.

Resumindo, este foi o primeiro estudo em Timor-Leste para pesquisa de polimorfismo no gene *pfk13*, não se tendo observado nenhuma mutação nas amostras antes e depois da introdução dos ACTs, nomeadamente nas posições Y493H, R539T, I543T, R561H ou C580Y. Em relação ao gene *pfmdr1*, no período entre 2003-2005 e 2012-2013, observou-se um aumento do alelo selvagem N86 e uma diminuição do alelo mutante 86Y, no entanto mais estudos têm de ser realizados para determinar o impacto na resistência/tolerância à lumefantrina. Foi observado pela primeira vez, nas amostras após a introdução do ACT, o polimorfismo N86F. No entanto devido à limitação do método usado no estudo do grupo antes da introdução dos ACTs, não podemos afirmar que este polimorfismo tenha surgido no período temporal que separa os dois grupos. Verificamos que este apresenta um impacto funcional da proteína, indo de acordo com o alelo mutante 86Y. Contudo, mais estudos têm de ser realizados para determinar o seu real impacto.

Apesar de não serem documentadas falências terapêuticas devido a parasitas resistentes em Timor-Leste, indo de acordo com os resultados obtidos, é muito importante que sejam mantidos estes estudos de monitorização das mutações, através do uso de marcadores moleculares, como base para vigilância de resistência aos ACTs. Este esforço é necessário, não só para garantir a eficácia dos programas de controlo e tratamento da malária, como garantir a eficácia no contexto de pré-eliminação da malária no qual se encontra Timor-Leste.

5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- Abdul-Ghani, R., Al-Maktari, M. T., Al-Shibani, L. A., & Allam, A. F. (2014) A better resolution for integrating methods for monitoring *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. *Acta Tropica*. 137:44-57.
- Almeida, A., Arez, A. P. Cravo, P. & Rosário, V. (2009) Analysis of genetic mutations associated with anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* from the Democratic Republic of East Timor. *Malaria Jornal*. 8:59.
- Amaratunga, C., Neal, A.T., & Fairhurst, R. M. (2014) Flow cytometry-based analysis of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the ring-stage survival assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(8):4938-40.
- Andjaparidze, A., Marwah, S.K. & Debnath, C. (2000) East Timor Health Sector Situation report. *World Health Organ East Timor*.
- Arbani, P.R. & Petersen, G. (1999) Malaria Epidemiological Profile – East and West Timor. *World Health Organization Geneva*. ISBN 92 4 158024
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.C., Khim, N., Kim, S., Duru, V. et al. (2014) A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 505(7481):50-5.
- Atroosh, W.M., Mekhlafi, H.M., Mahdy, M.A.K. & Surin, J. (2012) The detection of *pfprt* and *pfmdr1* point mutations as molecular markers of chloroquine drug resistance, Pahang, Malaysia. *Malaria Journal*. 11: 251.
- Beshir, K., Sutherland, C., Merinopoulos, I., Durrani, N., Leslie, T., Rowland, M. & Hallett, R. (2010) Amodiaquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria in Afghanistan Is Associated with the *pfprt* SVMNT Allele at Codons 72 to 76. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 3714–3716.
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I. & Drakeley, C. (2014) Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*.
- Cheeseman, I.H, Miller, B.A, Nair, S., Nkhoma, S., Tan, A., Tan, J., Saai, S., Phyto, A.P. et al. (2012) A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science*. 6; 336(6077).
- Choi, Y. & Chan, A.P. (2015) PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31(16): 2745-2747.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res*. 16 (22), 10881-10890
- Cowman, A.F., Galatis, D., & Thompson, J.K. (1994). Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91:1143–1147.
- Cowman, A. F., Berry, D. & Baum, J. (2012) The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J. Cell Biol*. Vol. 198 No. 6 961–971.

5. Referências Bibliográficas

- Dlamini, S., Beshir, K. & Sutherland C. (2010) Markers of anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Swaziland: identification of *pfmdr1*-86F in natural parasite isolates. *Malaria Jornal*. 9:68.
- Djimde, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y. et al. (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 344, 257-263.
- Djimde, A., Makanga, M., Kuhen, K. & Hamed, K. (2015). The emerging threat of artemisinin Resistance in malaria: focus on artemether-lumefantrine. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 1-15.
- Duraisingh, M.T. & Cowman, A.F. (2005) Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug resistance. *Acta Trop*. 94:181-190.
- Eklund, E. H. & Fidock, D. A. (2007) Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance. *Curr Opin Microbiol*. 10(4): 363–370.
- Escobar, C., Pateira, S., Lobo, E., Lobo, L., Teodosio, R., Dias, F., Fernandes, N., Arez A.P., Varandas, L. & Nogueira, F. (2015) Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* K13-Propeller in Angola and Mozambique after the Introduction of the ACTs. *Plos One*. 10(3):e0119215.
- Ezard, N., Burns, M., Lynch, C., Cheng, Q. & Edstein M.D. (2000) Efficacy of cloroquine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* infection in East Timor, 2000. *Acta Trop*. 88:87–90.
- Fairhurst, R. & Dondorp, A. (2016) Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiol Spectr*, 4(3).
- Hayward, R., Saliba, K.J. & Kirk, K. (2005) *pfmdr1* mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 55(4):1285-95.
- Happi, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Bolaji, O.M., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F. & Oduola, A.M. (2006) Association between mutation in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transport and *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*. 75:155 161.
- Holmgren, G., Gil, J.P., Ferreira, P.M., Veiga, M.I., Obonyo, C.O. & Bjorkman A. (2006) Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *Pfcr1* 76T and *Pfmdr1* 86Y. *Infect Genet Evol*. 6:309–314.
- Humphreys, G., Merinopoulos, I., Ahmed, J., Whitty, C., Mutabingwa, T.K, Sutherland, C.J. & Hallett, R.L. (2007) Amodiaquine and Artemether Lumefantrine Select Distinct Alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* Gene in Tanzanian Children Treated for Uncomplicated Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Kain, K., Keystone, J., Franke, E. & Lanar, D. (1991) Global Distribution of a Variant of the Circumsporozoite Gene of *Plasmodium vivax*. *The Journal of Infectious Diseases*. 164:208-10
- Kolaczinski, J. & Webster, J. (2003) Malaria Control in Complex Emergencies: the example of East Timor. *Trop Med Int Health*. 8:48–55.
- Kublin, J.G., Cortese, J.F., Njunju, E.M., Mukadam, R.A., Wirima, J.J., Kazembe, P.N., et al. (2003) Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 187: 1870–1875.

5. Referências Bibliográficas

- Leang, R., Canavati, S. E., Khim, N., Vestergaard L. S., Fuhrer, I. B., Kim, S., Denis, M. B., Heng, P., et al. (2016) Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:3884–3890.
- Lekana-Douki, J.B., Boutamba, S.D, Zatra, R., Edou S.E., Ekomy, H., Bisvigou, U. & Toure-Ndouo F.S. (2011) Increased prevalence of the *Plasmodium falciparum* *Pfmdr1* 86N genotype among field isolates from Franceville, Gabon after replacement of chloroquine by artemether–lumefantrine and artesunate–mefloquine. *Infect, Genet Evol.* 11:512-517.
- Lobo, E., Sousa, B., Rosa, S., Figueiredo, P., Lobo, L., Pateira, S., Fernandes, N. & Nogueira, F. (2014) Prevalence of *pfmdr1* alleles associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisinin-based combination therapy. *Malaria Jornal.*13:300.
- Martins, J. S., Zwi, A. B., Hobday, K., Bonaparte, F. & Kelly, P. M. (2012) The implementation of a new Malaria Treatment Protocol in Timor-Leste: challenges and constraints. *Health Policy and Planning.* 27:677–686
- Martins, J. S., Zwi, A. B., Hobday, K., Bonaparte, F. & Kelly, P. M. (2013) Changing the malaria treatment protocol policy in Timor-Leste: an examination of context, process, and actors involvement. *Health Research Policy and Systems.* 11:16.
- Mbaye, A., Dieye, B., Ndiaye, Y.D., Bei, A.K., Muna, A., Deme, A.B., Yade, M.S., Diongue, K. et al. (2016) Selection of N86F184D1246 haplotype of *Pfmdr1* gene by artemether-lumefantrine drug pressure on *Plasmodium falciparum* populations in Senegal. *Malar J.* 25;15(1):433.
- Menard, D., Khim, N., Beghain, J., Adegnika, A.A., Shafiul-Alam, M., Amodu, O., Rahim-Awab, G., Barnadas, C. et al. (2016) A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *The New England Journal of Medicine.* 374:2453-64.
- Menard, D. & Dondorp, A. (2017) Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med.*
- Mita, T., Kaneko, A., Lum, J.K., Bwijo, B., Takechi, M., Zungu, I.L., et al. (2003) Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 68: 413–415.
- Mita, T., Kaneko, A., Lum, J.K., Zungu, I.L., Tsukahara, T., Eto, H., et al. (2004) Expansion of wild type allele rather than back mutation in *pfcr1* explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol* 135: 159–163.
- Mita, T., Tanabe, K. & Kita, K. (2009) Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int.* 58: 201-209.
- Moonen, B., Cohen, J. M., Snow. R. W, Slutsker, L., Drakeley, C., Smith, D. L, Abeyasinghe, R. R., Rodriguez, M. H. et al. (2010) Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination. *The Lancet.* 376: 1592–603
- Morris, K. (2001) Growing pains of East Timor: health of an infant nation. *The Lancet.* Vol. 357

5. Referências Bibliográficas

- Nzila. A., Okombo, J., Ohuma, E. & Al-Thukair, A. (2012) Update on the *in vivo* tolerance and *in vitro* reduced susceptibility to the antimalarial lumefantrine. *J Antimicrob Chemother.*
- Norahmad, N.A., Razak, M., Abdullah, N.R., Sastu, U., Imwong, M., Muniandy, P.K., Saat, M., Muhammad, A., et al. (2016) Prevalence of *Plasmodium falciparum* Molecular Markers of Antimalarial Drug Resistance in a Residual Malaria Focus Area in Sabah, Malaysia. *Plos One.* 11(10): e0165515
- Otienoburu, S.D, Maïga-Ascofaré, O., Schramm, B., Jullien, V., Jones, J.J., Zolia, Y.M., Houzé, P., Ashley, E.A., Kiechel, J.R., Guérin, P.J, Le Bras, J. & Houzé, S. (2016) Selection of *Plasmodium falciparum* *pfert* and *pfmdr1* polymorphisms after treatment with artesunate-amodiaquine fixed dose combination or artemether-lumefantrine in Liberia. *Malar J.* 5;15:452.
- RDTL (2002). Health Profile Democratic Republic of Timor-Leste. *República Democrática de Timor-Leste – Ministério da Saúde.*
- Sibley C.H. & Price, R.N (2012) Monitoring antimalarial drug resistance: Applying lessons learned from the past in a fast-moving present. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist.* 126-133.
- Sidhu, A. B., Verdier-Pinard, D. & Fidock, D. A. (2002) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfert* mutations. *Science.* 298 (5591): 210-213.
- Sisowath, C., Stromberg, J., Martensson, A., Msellem, M., Obondo, C., Bjorkman, A. & Gil, J. (2005) In Vivo Selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* 86N Coding Alleles by Artemether-Lumefantrine (Coartem). *JID* 2005:191.
- Sisowath. C., Ferreira, P., Bustamante, L., Dahlstrom, S., Martensson, A., Bjorkman, A., Krishna, S. & Gil, J. (2007) The role of *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Tropical Medicine and International Health.*
- Veiga, M.I., Dhingra, S.K., Henrich, P., Straimer, J., Gnadig, N., Uhlemann, A-C., Martin, R.E., Lehane, A.M & Fidock, D. (2016) Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nature Communications.* 7:11553.
- Yapabandara, M., Sarmiento, R., Mota, M., Bosco, J., Martins, N. & Wickremasinghe, A. R. (2015) Evidence-based malaria control in Timor Leste from 2006 to 2012. *Malaria Journal.* 14:109
- Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S. et al. (2013) Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 13(12):1043-9.
- Wongsrichanalai, C., Pickard, A. L., Wernsdorfer, W. H., & Meshnick S. R. (2002) Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* (4): 209- 218.
- World Health Organization. (2001) Antimalarial Drug Combination Therapy - Report of a WHO Technical Consultation. *World Health Organization.* WHO/CDS/RBM/2001.35
- World Health Organization. (2005) Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *World Health Organization.* WHO/HTM/MAL/2005.1103
- World Health Organization. (2009) Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. *World Health Organization.* ISBN 978 92 4 159753 1
- World Health Organization. (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. *World Health Organization.*

5. Referências Bibliográficas

- World Health Organization. (2014). Emergence and spread of artemisinin resistance calls for intensified efforts to withdraw oral artemisinin-based monotherapy from the market. *World Health Organization*. WHO/HTM/GMP/2014.3
- World Health Organization. (2015) Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030. *World Health Organization*.
- World Health Organization. (2015a) Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition. *World Health Organization*.
- WHO-TL (2016). Profile Timor-Leste – World Malaria Report 2016. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_tls_en.pdf?ua=1
- World Health Organization. (2016) World malaria report 2016. *World Health Organization*.
- World Health Organization. (2016a) Elimination Malaria. *World Health Organization*. WHO/HTM/GMP/2016.3.
- World Health Organization. (2016b) Eliminating Malaria in the Greater Mekong Subregion - United to end a deadly disease. *World Health Organization*. WHO/HTM/GMP/2016.12.
- World Health Organization. (2016c) Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance – April 2016 Status Report. *World Health Organization*. WHO/HTM/GMP/2016.05
- World Health Organization. (2016d) Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance – October 2016 Status Report. *World Health Organization*. WHO/HTM/GMP/2016.11
- World Health Organization. (2016e) Country Cooperation Strategy – Timor-Leste 2015-2019. *World Health Organization*.
- World Health Organization. (2017) A framework for malaria elimination. *World Health Organization*.
- Wurtz, N., Fall, B., Pascual, A., Fall, M., Baret, E., Camara, C., Nakoulima, A., Diatta, B., et al. (2014) Role of *Pfmdr1* in *In Vitro Plasmodium falciparum* Susceptibility to Chloroquine, Quinine, Monodesethylamodiaquine, Mefloquine, Lumefantrine, and Dihydroartemisinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p.7032–7040.

6. Anexos

6. Anexos

ANEXO 1.

Posição dos *primers* na sequência do gene PF3D7_1343700.

Primers K13_PCR a cinzento escuro;

Primers K13_Nested cinzento claro.

Gene ID: PF3D7_1343700

```

ATGGAAGGAGAAAAAGTAAAAACAAAAGCAAATAGTATCTCGAATTTTTCTATGACGTAT
GATAGGGAATCTGGTGGTAACAGCAATAGTGATGATAAAAGCGGAAGTAGTAGCGAGAAT
GATTCTAATTCATTTATGAATCTAACTAGTGATAAAATGAGAAAACGGAATAATAGT
TTCCTTTTAAATAATAGTAGTTATGGAAATGTAAAGATAGCCTATTAGAATCCATTGAT
ATGAGTGTATTAGATTCTGAACCTTTGATAGTAAAAAGATTTTTTACCAAGTAATTTATCA
AGAACATTTAATAATATGTCTAAAGATAATATAGGAAATAAATATTTAAATAAATTGTTA
AATAAAAAAAGATACTATTACAAATGAAAAATAATAATATTAATCATAATAATAAAT
AATAATCTGACAGCAAATAATATAACTAATAATCTTATTAATAATAATATGAATCTCCA
TCAATTATGAATACCAACAAAAAGAGAATTTTTTAGATGCAGCAAATCTTATAAATGAT
GATTCTGGATTAAACAATTTAAAAAATTTTCAACTGTAAATAATGTAAATGATACTTAT
GAAAAGAAAAATTATTGAAACGGAATTAAGTGATGCTAGTGATTTTGAAAATATGGTAGGT
GATTTAAGAATTACATTTATTAATTGGTTAAAAAAGACACAAATGAATTTTATTCGAGAA
AAAGATAAATTATTTAAAGATAAGAAAGAACTAGAAATGGAAGAGTACGATTGTACAAA
GAATTAGAAAACCGTAAAAATATTGAAGAACAGAAATTACATGATGAAAGAAAGAAATTA
GATTATTGATATATCTAATGGTTATAAACAAATAAAAAAGAAAAAGAAACATAGGAAA
CGATTTGATGAAGAAAGATTAAGATTTTTTACAAGAAATCGATAAAATTAATTAGTATTA
TATTTAGAAAAAGAAAAATATTATCAAGAATATAAAAAATTTTGAGAATGATAAAAAAAA
ATTGTTGATGCAAATATTGCTACTGAACTATGATTGATATTAATGTTGGTGGAGCTATT
TTTGAAACATCTAGACATACCTTAACACAACAAAAAGATTCATTTATAGAGAAATTATTA
AGTGGAAGACATCATGTAACCAGAGATAAACAAAGGAAGAATATTCTTAGATAGGGATAGT
GAGTTATTTAGAATTATACTTAACCTTCTTAAGAAATCCGTTAACTATAACCCATACCAAAA
GATTTAAGTGAAAGTGAAGCCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTTTATGGTATTAAATTTTTA
CCATTCCCATTAGTATTTTGTATAGGTGGATTGATGGTGTAGAATATTTAAATTCGATG
GAATTATTAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTATGTGTACACCTATGTCTACCAAAAAA
GCTTATTTTGAAGTGCTGTATTGAATAATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAATAACTAT
GATTATAAGGCTTTATTTGAACTGAGGTGTATGATCGTTTAAAGAGATGTATGGTATGTT
TCAAGTAATTTAAATATACCTAGAAGAAATAATTGTGGTGTACGTCAAATGGTAGAATT
TATTGTATTGGGGATATGATGGCTCTTCTATTATACCGAATGTAGAAGCATATGATCAT
CGTATGAAAGCATGGGTAGAGGTGGCACCTTTGAATACCCCTAGATCATCAGCTATGTGT
GTTGCTTTTGATAATAAAATTTATGTCATTGGTGGAATAATGGTGAGAGATTAAATTCT
ATTGAAGTATATGAAGAAAAATGAATAAATGGGAACAATTTCCATATGCCTTATTAGAA
GCTAGAAGTTCAGGAGCAGCTTTTAATTACCTAATCAAATATATGTTGTTGGAGGTATT
GATAATGAACATAACATATTAGATTCGGTTGAACAATATCAACCATTTAATAAAAATGG
CAATTTCTAAATGGTGTACAGAGAAAAAATGAATTTTGGAGCTGCCACATTGTCAGAT
TCTTATATAAATTACAGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAATTCATGTCAATTTCTTTCA
CCAGATACAAATGAATGGCAGCTTGGCCCATCTTTATTAGTTCACAGATTTGGTCACTCC
GTTTTAATAGCAAATATATAA

```

Sequence Length: 2181 b

ANEXO 2.

Posição dos *primers* na sequência do gene PF3D7_0523000.

Primers MDR1 a cinzento escuro.

Codão 86 a cinzento claro.

```
>Pf3D7_05_v3 | Plasmodium falciparum 3D7 | 957890 to 962149
ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAGAAAAAGATGGTAACCTCAGTATCAAAGAAGAGGTTGAA
AAAGAGTTGAACAAAAAGAGTACCGCTGAATTATTTAGAAAAATAAAGAATGAGAAAATA
TCATTTTTTTTTACCGTTTAAATGTTTACCTGCACAACATAGAAAATTATTATTTATATCA
TTTGTATGTGCTGTATTATCAGGAGGAACATTACCTTTTTTTATATCTGTGTTTGGTGTA
ATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATCT
ATAGGTTTGTATACAATTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTACA
TCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTTATCAAGATGGA
CAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGAA
CAA GTGAGTT CAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTACATATGCCAGTTCCTTT
TTAGGTTTATATATTTGGTCATTAATAAAAAATGCACGTTTGACTTTATGTATTACTTGC
GTTTTTCCGTTAATTTATGTTTGTGGTGTCAATGTAAATAAGAAAGTAAATTAATAAAA
AAAACATCTTTGTTATATAATAACAATACCATGTCCATTATAGAAGAGGCTTTAATGGGA
ATAAGAAGCTGTTGCAAGTTATTGTGGAGAAAAGACTATATTAACAAATTTAATTTGTCC
GAACTTTTTATAGTAAATATATTTTAAAAGCTAATTTTGTAGAAGCATTACATATAGGT
TTAATAAATGGTTTAATTTTAGTTTCTTATGCATTTCGGTTTTTGGTATGGTACAAGAATT
ATTATAAATAGTGAACGAATCAATACCCCAATAATGATTTTAATGGTGCCTCAGTTATA
TCCATTTTATTAGGTGTACTTATTAGTATGTTTATGTTAACAATTATCTTACCAAATATA
ACAGAATATATGAAAGCTTTAGAAGCAACAAATAGTTTATATGAAATAATAAATCGAAAA
CCATTAGTTGAAAATAATGATGATGGAGAAACATTACCAAATATTAAAAAAATTGAATTT
AAAAATGTAAGATTTTATTATGATACTAGAAAAGATGTTGAAATTTATAAAGATTTAAGT
TTTACTCTAAAAGAAGGGAAAACATATGCATTTGTGGGAGAATCAGGTTGTGGGAAATCA
ACCATACTAAAATTAATTGAAAGACTTTATGATCCAACCGAAGGAGATATTATTGTAAAT
GATTCTCATAATTTAAAAGATATTAATTTGAAATGGTGGAGATCAAAAATTGGAGTTGTT
AGTCAAGATCCATTATTATTTAGTAATTCAATTA AAAAATAATATTAATATAGTTTATAT
AGTTTAAAAGATTTAGAAGCAATGGAAAATTATTATGAAGAAAATACTAATGATACATAT
GAAAATAAAAATTTTTCTTTAATTTTGAATTTCTATGACATCAAATGAATTATTAGAAATG
AAAAAGAATATCAAATATTAAGATTCTGATGTTGTTGATGTGTCCAAAAAAGTACTT
ATACATGATTTTGTATCATCATTACCAGATAAATATGATACCTTAGTAGGTTCCAATGCA
TCCAAATTATCAGGTGGACAAAAACAAAGAATATCCATTGCAAGAGCAATTATGAGAAAT
CCTAAAATTTCTAATTTCTGATGAAGCTACATCTTCTTTAGATAATAAATCTGAGTATTTA
GTACAAAAAACAATTAATAATTTGAAAGGAAATGAAAATAGAATAACTATTATTATAGCA
CATAGATTAAGTACTATAAGATATGCCAATACAATTTTTGTTTTATCAAATAGAGAAAGA
AGTGATAATAATAATAATAATAATGATGATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT
AACAAAATTAATAATGAGGGTAGCTATATTATTGAACAAGGTACACATGATAGTCTTATG
AAAAATAAAAATGGTATTTATCATCTTATGATAAATAATCAAAAGATTTTCATCAAATAAA
TCTTCAAATAATGAAATGATAATGGATCGGATAACAAAAGTAGCGCTTATAAAGACTCA
GATACAGGTAATGATGCAGATAATATGAATAGTTTATCAATACATGAAAATGAAAATATA
TCAAATAATCGTAATTGTAAAAATACAGCAGAAAATGAAAAAGAAGAGAAAGTTCCATTT
TTCAAAGAATGTTTAGAAGAAAAAAGAAAGCACCAACAATTTACGTATCATTTATAAA
GAAATATTTTCATATAAAAAAGATGTTACTATAATTTCTTTAGTATTTTAGTAGCTGGA
```

GGATTATATCCCGTATTTGCTTTATTATATGCTAGATATGTATCTACATTATTTGATTTT
GCAAATCTAGAATATAACTCAAATAAATATTCTATATATATTCTACTTATTGCTATTGCT
ATGTTTCATTTTCAGAAACACTCAAAAACCTATTATAACAACAAAATAGGAGAAAAAGTCGAA
AAGACTATGAAACGTAGATTATTTGAAAATATATTATATCAAGAAATGAGTTTCTTTGAT
CAAGATAAAAAATACCCCAGGTGTTTTATCTGCACATATTAATAGAGATGTACATTTATTA
AAAACGGGTTTAGTAAATAATATTGTTATTTTCTCTCATTTCATAATGCTCTTTCTGGTT
AGCATGGTTATGTCCTTTTATTTTTGTCCAATTGTTGCAGCTGTATTAACTTTTATATAT
TTTATTAATATGCGTGTATTTGCTGTAAGAGCTAGATTAACCAAAGTAAAGAAATTGAG
AAAAAAGAAAATATGTCAAGCGGAGTTTTTGCATTTAGTTCAGATGATGAAATGTTTAAA
GATCCAAGTTTTTTAATACAGGAAGCATTTTTATAATATGCATACTGTTATTAATTATGGT
TTAGAAGATTATTTCTGTAATTTGATAGAAAAAGCTATTGATTATAAAAAATAAAGGACAA
AAAAGAAGAATTATTGTAAATGCAGCTTTATGGGGATTTCAGTCAAAGCGCTCAATTATTT
ATTAATAGTTTTGCCTATTGGTTTGGATCCTTCTTAATTAAGAGGTACTATATTAGTT
GATGACTTTTATGAAATCCTTATTTACTTTTATATTTACTGGTAGTTATGCTGGAAAATTA
ATGTCCTTAAAAGGAGATTCAGAAAATGCAAAATTATCATTTGAGAAATATTATCCATTA
ATGATTAGAAAATCAAATATTGATGTAAGAGATGATGGTGGAATAAGAATAAATAAAAAAT
TTAATAAAAGGTAAAGTTGATATTAAAGATGTAAATTTCCGTTATATTTCAAGACCAAAT
GTACCTATTTATAAAAAATTTATCTTTTACATGTGATAGTAAAAAACTACAGCAATCGTT
GGAGAAACAGGTAGTGGAAAATCAACTTTTATGAATCTCTTATTAAGATTTTATGACTTG
AAAAATGATCACATTATATTAAAAAATGATATGACAAATTTTCAAGATTATCAAAATAAT
AATAATAATTCATTGGTTTTAAAAAATGTAAATGAATTTTCAAACCAATCTGGATCTGCA
GAAGATTATACTGTATTTAATAATAATGGAGAAATATTATTAGATGATATTAATATATGT
GATTATAACTTAAGAGATCTTAGAACTTATTTTCAATAGTTAGTCAAGAACCCATGTTA
TTTAATATGTCCATATATGAAAATATCAAATTTGGAAGAGAAGATGCAACATTGGAAGAT
GTTAAACGTGTTAGTAAGTTTGTCTGCTATAGATGAATTTATCGAATCATTACCAAATAAA
TATGATACAAATGTTGGACCATATGGTAAAAGCTTATCAGGTGGACAAAAACAGAGAATA
GCTATAGCTAGAGCATTATTAAGAGAACCTAAAATATTATTATTAGATGAAGCAACATCA
TCACTTGATTCCAATTCTGAGAAATTAATTGAAAAAACTATTGTAGATATTAAAGATAAA
GCTGACAAAACATTATTACTATTGCCACAGAATTGCATCTATAAAACGATCAGACAAA
ATTGTGGTATTTAATAACCCTGATCGAAATGGAACCTTTGTACAGTCACATGGAACACAC
GATGAATTATTATCAGCACAAAGATGGAATATATAAAAAATATGTAAAATTAGCTAAATGA
4260bp

ANEXO 3.**Polimorfismo N86 → 86Y**

	211						280
MDR1	TTACCTTTTT	TTATATCTGT	GTTTGGTGTA	ATATTAAAGA	ACATGAATTT	AGGTGATGAT	ATTAATCCTA
21+86NF		NNT	GTTTGGTGTA	ATATTAAAGA	ACATG TAT TT	AGGTGATGAT	ATTAATCCTA
ConsensusnnT	GTTTGGTGTA	ATATTAAAGA	ACATGaATTT	AGGTGATGAT	ATTAATCCTA
	281						350
MDR1	TAATATTATC	ATTAGTATCT	ATAGGTTTAG	TACAATTTAT	ATTATCAATG	ATATCAAGTT	ATTGTATGGA
21+86NF	TAATATTATC	ATTAGTATCT	ATAGGTTTAG	TACAATTTAT	ATTATCAATG	ATATCAAGTT	ATTGTATGGA
Consensus	TAATATTATC	ATTAGTATCT	ATAGGTTTAG	TACAATTTAT	ATTATCAATG	ATATCAAGTT	ATTGTATGGA
	351						420
MDR1	TGTAATTACA	TCAAAAATAT	TAAAAACTTT	AAAGCTTGAA	TATTTAAGAA	GTGTTTTTTA	TCAAGATGGA
21+86NF	TGTAATTACA	TCAAAAATAT	TAAAAACTTT	AAAGCTTGAA	TATTTAAGAA	GTGTTTTTTA	TCAAGATGGA
Consensus	TGTAATTACA	TCAAAAATAT	TAAAAACTTT	AAAGCTTGAA	TATTTAAGAA	GTGTTTTTTA	TCAAGATGGA
	421						490
MDR1	CAATTCATG	ATAATAATCC	TGGATCTAAA	TTAAGATCTG	ATTTAGATTT	TTATTTAGAA	CAAGTGAGTT
21+86NF	CAATTCATG	ATAATAATCC	TGGATCTAAA	TTAAGATCTG	ATTTAGATTT	TTATTTAGAA	CAAGTGAGTT
Consensus	CAATTCATG	ATAATAATCC	TGGATCTAAA	TTAAGATCTG	ATTTAGATTT	TTATTTAGAA	CAAGTGAGTT
	491						560
MDR1	CAGGAATTGG	TACGAAATTT	ATAACAATTT	TTACATATGC	CAGTTCCTTT	TTAGGTTTAT	ATATTTGGTC
21+86NF	CAGGAATTGG	TACGA					
Consensus	CAGGAATTGG	TACGA.....

Polimorfismo N86 → 86F

	211						280
MDR1	TTACCTTTTT	TTATATCTGT	GTTTGGTGTA	ATATTAAAGA	ACATGAATTT	AGGTGATGAT	ATTAATCCTA
11+PF		TTCTGT	GTTTGGTGTA	ATATTAAAGA	ACATG TTT TT	AGGTGATGAT	ATTAATCCTA
ConsensusaTCTGT	GTTTGGTGTA	ATATTAAAGA	ACATGaATTT	AGGTGATGAT	ATTAATCCTA
	281						350
MDR1	TAATATTATC	ATTAGTATCT	ATAGGTTTAG	TACAATTTAT	ATTATCAATG	ATATCAAGTT	ATTGTATGGA
11+PF	TAATATTATC	ATTAGTATCT	ATAGGTTTAG	TACAATTTAT	ATTATCAATG	ATATCAAGTT	ATTGTATGGA
Consensus	TAATATTATC	ATTAGTATCT	ATAGGTTTAG	TACAATTTAT	ATTATCAATG	ATATCAAGTT	ATTGTATGGA
	351						420
MDR1	TGTAATTACA	TCAAAAATAT	TAAAAACTTT	AAAGCTTGAA	TATTTAAGAA	GTGTTTTTTA	TCAAGATGGA
11+PF	TGTAATTACA	TCAAAAATAT	TAAAAACTTT	AAAGCTTGAA	TATTTAAGAA	GTGTTTTTTA	TCAAGATGGA
Consensus	TGTAATTACA	TCAAAAATAT	TAAAAACTTT	AAAGCTTGAA	TATTTAAGAA	GTGTTTTTTA	TCAAGATGGA
	421						490
MDR1	CAATTCATG	ATAATAATCC	TGGATCTAAA	TTAAGATCTG	ATTTAGATTT	TTATTTAGAA	CAAGTGAGTT
11+PF	CAATTCATG	ATAATAATCC	TGGATCTAAA	TTAAGATCTG	ATTTAGATTT	TTATTTAGAA	CAAGTGAGTT
Consensus	CAATTCATG	ATAATAATCC	TGGATCTAAA	TTAAGATCTG	ATTTAGATTT	TTATTTAGAA	CAAGTGAGTT
	491						560
MDR1	CAGGAATTGG	TACGAAATTT	ATAACAATTT	TTACATATGC	CAGTTCCTTT	TTAGGTTTAT	ATATTTGGTC
11+PF	CAGAAATTGG	TACGA					
Consensus	CAGaAATTGG	TACGA.....

ANEXO 4.

Tabela 7 – Resultado da análise dos polimorfismos do gene *pfk13*, pesquisados nas amostras do grupo A, referente ao período 2003-2005.

Grupo A	<i>pfk13</i>					
Amostra	458	493	539	543	561	580
181d	na	na	na	na	na	na
62los	N	Y	R	I	R	C
107Alos	na	Y	R	I	R	C
108Alos	N	Y	R	I	R	C
110Alos	N	Y	R	I	R	C
111Alos	na	Y	R	I	R	C
112Alos	na	Y	R	I	R	C
113Alos	na	Y	R	I	R	C
114Alos	na	Y	R	I	R	C
116Alos	na	Y	R	I	R	C
117Alos	na	Y	R	I	R	C
118Alos	na	Y	R	I	R	C
119Alos	na	Y	R	I	R	C
120Alos	na	Y	R	I	R	C
53los	na	na	na	na	na	na
55sup	na	Y	R	I	R	C
68sup	na	Y	R	I	R	C
Sa2	na	Y	R	I	R	C
Sa21	na	Y	R	I	R	C
Sa30	na	Y	R	I	R	C
Sa54	na	Y	R	I	R	C

N= Asparagina; C= Cisteína; Y= Tirosina; T= Treonina; I= Isoleucina; R= Arginina; na: não amplificado.

ANEXO 5.

Tabela 8 – Resultado da análise dos polimorfismos do gene *pfmdr1* e *pfk13*, pesquisados nas amostras do grupo B, referente ao período 2012-2013.

Grupo B	<i>pfmdr1</i>	<i>pfk13</i>					
Amostra	86	458	493	539	543	561	580
1	na	na	na	na	na	na	na
2	na	na	na	na	na	na	na
3	F	na	Y	R	I	R	C
4	N	na	Y	R	I	R	C
5	N	na	Y	R	I	R	C
6	N	na	Y	R	I	R	C
7	na	na	na	na	na	na	na
8	na	na	na	na	na	na	na
9	Y	na	Y	R	I	R	C
10	Y	na	Y	R	I	R	C
11	F	na	Y	R	I	R	C
12	Y	na	Y	R	I	R	C
13	Y	na	Y	R	I	R	C
14	N	na	Y	R	I	R	C
15	N	na	Y	R	I	R	C
16	N	na	na	na	na	na	na
17	Y	na	Y	R	I	R	C
18	N	na	Y	R	I	R	C
19	Y	na	na	na	na	na	na
20	F	na	Y	R	I	R	C
21	Y	na	Y	R	I	R	C
22	N	na	Y	R	I	R	C
23	F	na	na	na	na	na	na
24	N	na	na	na	na	na	na
25	N	na	Y	R	I	R	C
26	N	N	Y	R	I	R	C
27	Y	N	Y	R	I	R	C
28	N	N	Y	R	I	R	C
29	N	na	Y	R	I	R	C
30	Y	N	Y	R	I	R	C

F= Fenilalanina; N= Asparagina; C= Cisteína; Y= Tirosina; T= Treonina; I= Isoleucina; R= Arginina;
na: não amplificado.